

526,543

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 3 月 18 日 (18.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/022082 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 38/00, 48/00,  
39/395, 31/7088, A61P 15/00, 37/02, C12N 15/09, C12Q  
1/68, G01N 33/50, 33/15, 33/68, 33/53千葉県 銚子市 中央町 2-8 ヒゲタ醤油株式会社 研  
究開発部内 Chiba (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011268

(74) 代理人: 水野 昭宣 (MIZUNO, Akinobu); 〒150-0044 東  
京都 渋谷区 円山町 2 番 1 2 ライオンズマンショ  
ン渋谷道玄坂 3 0 3 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2003 年 9 月 3 日 (03.09.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-259268 2002 年 9 月 4 日 (04.09.2002) JP(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,  
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会  
社 プロテイン・エクスプレス (PROTEINEXPRESS  
CO., LTD.) [JP/JP]; 〒288-0041 千葉県 銚子市 中央町  
2-1 1 Chiba (JP).(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 今川 和彦  
(IMAKAWA, Kazuhiko) [JP/JP]; 〒113-8657 東京都 文  
京区 弥生 1 丁目 1 番 1 号 東京大学内 Tokyo (JP). 永  
岡 謙太郎 (NAGAOKA, Kentaro) [JP/JP]; 〒441-0943  
静岡県 駿東郡 長泉町 下土狩 1 1 7 9 Shizuoka (JP).  
渡辺 史子 (WATANABE, Fumiko) [JP/JP]; 〒288-8680添付公開書類:  
— 国際調査報告書2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: EMBRYO IMPLANTATION INHIBITOR

(54) 発明の名称: 胚着床制御剤

(57) Abstract: To establish pregnancy, it is important that an embryo well communicates with the parent body and thus is allowed to implant in the uterine wall. Clarification and regulation of a factor mediating the embryo-parent body communication, if possible, enable the development of means of treating and preventing disorders such as infertility. On the other hand, it also becomes possible to safely avoid pregnancy thereby. A protein factor having been known as a 10 KDa protein (IP-10) usually induced by interferon  $\gamma$  is identified as a factor which participates in the immune process, activation of embryo migration, promotion of embryo implantation in the uterine wall, exertion of the chemotaxis activity, etc. during the period of the implantation of the embryo in the parenteral body and thus controls the implantation of the embryo in the uterine wall. Using this factor, it is possible to develop and provide a remedy for infertility, a pregnant efficiency enhancer, an agent for inducing an embryo into the uterine during the implantation period, an agent controlling the fetal-parenteral body interaction and so on.

(57) 要約: 妊娠成立においては胚と母体とのコミュニケーションそして胚が母体の子宮壁に着床することが許容されることが重要である。この胚と母体とのコミュニケーションを仲介する因子を解明し、それを制御することが可能になれば、不妊症などの障害の治療や予防手段の開発が可能であり、一方では避妊を安全に行う途も開かれる。インターフェロン・ガンマで通常誘起される 10KDa のタンパク質 (IP-10) として知られていたタンパク質因子が胚の母体への着床時期に免疫過程や胚遊走活性化、胚の子宮壁への着床促進あるいはケモタキシス活性発揮などに関与し、胚が子宮壁に着床するのをコントロールしている因子であることが同定された。これを利用して不妊治療剤、妊娠効率促進剤、着床期に胚を子宮に誘因する剤、胚仔と母体との間の相互作用調整剤などが開発提供できる。

WO 2004/022082 A1

BEST COPY

## 明 細 書

## 胚着床制御剤

技術分野

本発明は、妊娠現象の着床において胚と母体との間のコミュニケーションを調整制御する因子の利用技術に関する。より具体的には、本発明は、IP-10 が胚の着床並びにその過程において重要な機能を有することに基礎をおいた技術に関する。

背景技術

着床とは胚仔と母体システムとの間で細胞増殖や分化が協調的に進行し、初期胎盤の形成までも含んだプロセスである。反芻動物では、着床期に高い頻度で胚が失われる事態が起こり(Roberts R.M. et al., Oxf. Rev. Reprod. Biol., 12: 147-180(1990))、これは胚仔と母体組織との間のコミュニケーションが不成功に終わったためだと考えられている。一旦該コミュニケーションの確立が成功すると、母体システムは生理的にも免疫学的にも胚仔の受容をすることができるようになり、胚仔が付着、浸潤し、その後に胎盤が形成されることとなる。

インターフェロン・タウ(IFN- $\tau$ ; 反芻動物における着床前の栄養膜(トロホブラスト)細胞により産生される抗黄体退行活性を持つタンパク質)は、他のインターフェロンと同様に抗ウイルス活性、細胞増殖抑制活性を有し、さらに免疫調整作用を有するのではないかと考えられている。

反芻動物では、成長する胚仔によって産生される主要な胚仔タンパク質であるインターフェロン・タウ(IFN- $\tau$ )が、母体の妊娠の認識過程に関与している(Martal J. et al., J. Reprod. Fertil., 56:63-72(1979); Godkin J.D. et al., J. Reprod. Fertil., 65:141-150(1982); Imakawa K. et al., Nature, 330:377-379(1987); Stewart H.J. et al., J. Endocrinol., 115:R13-R15(1987); R

Roberts R.M. et al., *Endocr. Rev.*, 13:432-452(1992))。ヒツジでは胚仔は妊娠の8～9日目からIFN- $\tau$ を産生し始める。16日目に最高に産生され、その後IFN- $\tau$ の産生は胚仔が母親の子宮内膜に付着し始めるにしたがい低下し始め、22～23日目までには胚仔はIFN- $\tau$ を産生しなくなる(Guillomot M. et al., *Bio Cell*, 68:205-211(1990); Roberts R.M. et al., *Proc. Soc. Exp. Biol Med.*, 200:7-18(1992); Flint A.P.F. et al., *Mol. Cell. Endocrinol.*, 100:93-95(1994))。IFN- $\tau$ は黄体の退行を妨げ(エストロゲンレセプターの発現を阻害することにより少なくとも一部を妨げ)、オキシトシンレセプターのエストロゲンによる刺激を防止し、子宮内膜のPGF<sub>2 $\alpha$</sub> の間歇的な放出を抑制する(Flint A.P.F. et al., *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 43:13-25 (1991); Spencer T.E. et al., *Endocrinology*, 136:4932-4944(1995); Spencer T.E. et al., *Endocrinology*, 137:1144-1147(1996))。さらに、IFN- $\tau$ はリンパ球の分化及びサイトカイン産生を制御しており(リンパ球の分化: Newton G.R. et al., *Am. J. Reprod. Immunol.*, 19:99-107 (1989); Pontzer C.H. et al., *Cancer Res.*, 51:5304-5307 (1991); Skopets B. et al., *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 34:81-96 (1992); Assal-Meliani A. et al., *J. Reprod. Immunol.*, 25:149-65 (1993)、サイトカイン産生: Tuo W. et al., *J. Interferon Cytokine Res.*, 19:79-87(1999); Emond V. et al., *Biol. Reprod.*, 62:1728-1737(2000))、IFN- $\tau$ が反芻有蹄動物の着床期の間局所的に免疫調整の過程において重要な役割を果たしていることを示している。

IP-10 (interferon- $\gamma$  inducible protein 10 kDa)は、主に白血球のサブセットに対するケモタクティック活性を介して炎症応答並びに免疫応答の多くの局面を制御しているケモカインファミリーの一員である。マウス及びヒトにおける研究からIP-10はC-X-Cケモカイン類の一員であり、例えばマクロファージ、線維芽細胞、星状(アストロサイト)細胞、ケラチノサイト細胞、上皮細胞、内皮細胞などを含めた様々なタイプの細胞において誘導されている(Luster A. et al., *Nature*, 315:672-676 (1985); Ohmori Y. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168:1261-1267 (1990); Sauty A. et al., *J. Immunol.*, 162:3549-3558

(1999); Albanesi C. et al., J. Immunol., 165:1395-1402(2000); Huang D. et al., Immunol. Rev., 177:52-67(2000))ことが示されている。IP-10はC-X-C型ケモカインのレセプター3(CXCR3)を介して優先的にNK細胞並びにTh1表現型の活性化されたT細胞を標的としている。

### 発明の開示

胚仔（コンセプタス又は受胎産物：胚並びに胚膜を指す）と母体との間の生化学的な情報伝達は着床の成功並びにその後起こる胎盤形成にとって重要である。特に、反芻動物では、着床期に高い頻度で胚が失われる事態が起こることから、妊娠の成立を制御している因子の解明は、強く求められている。特に、妊娠成立過程において、胚仔側のシグナルに対する母体側の応答因子についての解明が待たれている。

上記妊娠成立過程を制御する因子を解明するため、鋭意研究を進め、特にヒツジの妊娠と相関しているという特徴を有する分子を決定するための研究の過程で、本発明者等は妊娠17日目の子宮内膜及び発情周期15日目の子宮内膜からそれぞれRNAを抽出し、該RNAからcDNAを作出後、cDNAサブトラクション解析からインターフェロン・ガンマで誘起される10 KDaのタンパク質(IP-10)を同定することに成功した。すなわち、妊娠17日目の雌ヒツジと発情周期15日目の雌ヒツジの子宮内膜組織の間でのcDNAサブトラクション解析の結果、インターフェロン・ガンマで誘起される10 KDaのヒツジのタンパク質(ヒツジIP-10)(C-X-C型ケモカインファミリーに属し、グルタミン-ロイシン-アルギニン(ELR)モチーフを欠いている)が同定された。

さらに、ノーザンブロット分析の結果、妊娠初期の子宮内膜にIP-10 mRNAが相当量見出され、そしてその量は発情周期の子宮内膜におけるよりもかなり多いものであることも見出すことに成功した。そして、CXCR3(IP-10のレセプター)mRNAの発現をRT-PCR法で検出してみると、妊娠している子宮の内膜では発情周期の状態にある子宮内膜におけるよりも僅かながらその発現が大きいことも見出すことに成功した。

本発明者等は、IFN- $\tau$ 及びIFN- $\gamma$  mRNA（これらはIP-10の発現を誘導している可能性がある）の変動についてもノーザンブロット分析及びRT-PCR法で測定した。その結果、IFN- $\tau$ 及びIFN- $\gamma$  mRNAは胚仔や妊娠している子宮の内膜では量的に高レベルであったことも見出した。また、IFN- $\gamma$  mRNAは発情周期の状態にある子宮内膜においても検出された。免疫組織化学的解析の結果、IP-10とIFN- $\gamma$ の双方のタンパク質は、子宮の管腔上皮、腺上皮、上皮下間質に局在していた。IP-10とIFN- $\gamma$ の双方のタンパク質は、発情周期の状態にある雌ヒツジにおいてその偏在が認められたが、IP-10染色の強度は周期性の状態にある子宮内膜では最小限のものであった。in situ ハイブリダイゼーション分析の結果、IP-10 mRNAは妊娠している子宮の上皮下間質に偏在していた。一方、発情周期の状態にある雌ヒツジにおいてはIP-10 mRNAは検出されなかった。単球によるIP-10 mRNAの発現は、用量依存的にIFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 及びIFN- $\tau$ によって刺激されたが、IFN- $\tau$ がIP-10 mRNAを増加するのに最も効果が高かった。子宮内膜の細胞片培養実験における解析の結果、IP-10 mRNAは低量のIFN- $\tau$ によっても刺激された。これらの結果から、妊娠初期の子宮において観察されるヒツジIP-10の発現はIFN- $\tau$ によって誘導されていると考えられる。こうしてIFN- $\tau$ とIP-10との間の相互作用が胚仔と母体組織との間での免疫学的情報伝達の確立に重要なものであるとの認識に至った。同様なことは、ヤギIP-10に関してもそれを観察することに成功した。本発明者等は、IP-10は各種の動物に広くその存在が認められ、その相同性も、例えばヒツジとヒトの間では、かなりの程度認められることから、IP-10を利用した着床制御技術を提供することができるとの認識を有するに至り、本発明を完成せしめた。

代表的には、本発明は、

〔1〕 タンパク質IP-10及びIP-10において少なくとも1以上のアミノ酸残基が欠失、付加及び／又は置換されているIP-10類縁体であって全長のIP-10と実質的に同等又は同一の生物活性を有するIP-10類縁体あるいはIP-10誘導体から成る群から選ばれたものを有効成分として含有し、

(1) 胚遊走活性化剤、(2) 胚の子宮壁への着床促進剤、(3) 不妊治療剤、(4) 妊

娠促進剤、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整剤、(6) 免疫細胞遊走活性化剤、及び(7) 子宮内免疫機能調整剤

から成る群から選ばれたものであることを特徴とする医薬及び／又は動物医薬；

〔2〕 IP-10 が、ヒト、ウシ、スイギュウ、ウマ、ロバ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、ブタ、シカ、トナカイ、ヤク、イヌ、ネコ、サルを包含する哺乳動物由来のものであることを特徴とする上記〔1〕記載の医薬及び／又は動物医薬；

〔3〕 IP-10 及びIP-10 において少なくとも1以上のアミノ酸残基が欠失、付加及び／又は置換されているIP-10 類縁体であって全長のIP-10 と実質的に同等又は同一の生物活性を有するIP-10 類縁体あるいはIP-10 誘導体から成る群から選ばれたもので、試料を処理し、

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性

から成る群から選ばれた生物学的活性を得ることを特徴とする方法；

〔4〕 IP-10 及びIP-10 において少なくとも1以上のアミノ酸残基が欠失、付加及び／又は置換されているIP-10 類縁体であって全長のIP-10 と実質的に同等又は同一の生物活性を有するIP-10 類縁体あるいはIP-10 誘導体から成る群から選ばれたものを含有し、上記〔3〕記載の方法に使用することを特徴とする試薬；

〔5〕 IP-10 活性を測定し、

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性

から成る群から選ばれた生物学的活性をアッセイすることを特徴とするアッセイ；

〔6〕 上記〔5〕記載のアッセイに使用することを特徴とする試薬；

〔7〕 IP-10 及びIP-10 において少なくとも1以上のアミノ酸残基が欠失、付加及び／又は置換されているIP-10 類縁体であって全長のIP-10 と実質的に

同等又は同一の生物活性を有するIP-10 類縁体あるいはIP-10 誘導体から成る群から選ばれたものをコードする塩基配列を含有する核酸を有効成分として含有し、

、

(1) 胚遊走活性化剤、(2) 胚の子宮壁への着床促進剤、(3) 不妊治療剤、(4) 妊娠促進剤、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整剤、(6) 免疫細胞遊走活性化剤、及び(7) 子宮内免疫機能調整剤

から成る群から選ばれたものであることを特徴とする医薬及び／又は動物医薬；

〔8〕 (i) 配列表の配列番号：1 で表される塩基配列のうち、少なくともオープンリーディングフレーム部分を有するもの、

(ii) 少なくとも該(i) の配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズすることのできる塩基配列、

(iii) 図2 あるいは配列番号：2 のポリペプチドと少なくとも80%の相同性を有するアミノ酸配列を持ち、且つ

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性

から成る群から選ばれた生物学的活性を有するかあるいは同等の抗原性を包含した、該IP-10 (例えば、ヒツジIP-10) と実質的に同等の生物学的活性を有するペプチドをコードする塩基配列、

から成る群から選ばれた核酸を有効成分として含有し、

(1) 胚遊走活性化剤、(2) 胚の子宮壁への着床促進剤、(3) 不妊治療剤、(4) 妊娠促進剤、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整剤、(6) 免疫細胞遊走活性化剤、及び(7) 子宮内免疫機能調整剤

から成る群から選ばれたものであることを特徴とする医薬及び／又は動物医薬；

〔9〕 (A) タンパク質IP-10 及びIP-10 において少なくとも1 以上のアミノ酸残基が欠失、付加及び／又は置換されているIP-10 類縁体であって全長のIP-10 と実質的に同等又は同一の生物活性を有するIP-10 類縁体あるいはIP-10 誘

導体から成る群から選ばれたもの若しくはその塩又は

(B) (i) 配列表の配列番号：1 で表される塩基配列のうち、少なくともオープンリーディングフレーム部分を有するもの、

(ii) 少なくとも該(i) の配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズすることのできる塩基配列、

(iii) 図2あるいは配列番号：2 のポリペプチドと少なくとも80%の相同性を有するアミノ酸配列を持ち、且つ

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性

から成る群から選ばれた生物学的活性を有するかあるいは同等の抗原性を包含した、該IP-10 (例えば、ヒツジIP-10) と実質的に同等の生物学的活性を有するペプチドをコードする塩基配列、

から成る群から選ばれた核酸

の生物学的活性、例えば(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物学的活性を促進又は阻害する化合物又はその塩を含有していることを特徴とする医薬；

[10] (A) IP-10 及びIP-10 において少なくとも1以上のアミノ酸残基が欠失、付加及び／又は置換されているIP-10 類縁体であって全長のIP-10 と実質的に同等又は同一の生物活性を有するIP-10 類縁体あるいはIP-10 誘導体から成る群から選ばれたもの若しくはその塩、(B) 前記(A) をコードする核酸及び該核酸を含有するベクターあるいは該核酸又は該ベクターで形質転換された宿主細胞から成る群から選ばれたものを使用し、前記IP-10 又はIP-10 類縁体あるいはIP-10 誘導体若しくはその塩又は前記核酸の生物学的活性、例えば(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物学的活性を促進又は阻害する化合物をスク



リーニングする方法又はそのためのスクリーニングキット；

〔11〕 IP-10 の産生を亢進し、不妊症の発症及び／又は進展を防ぐ化合物のスクリーニング方法又はスクリーニングキットである上記〔10〕記載のスクリーニング方法又はスクリーニングキット；

〔12〕 上記〔10〕又は〔11〕記載のスクリーニング方法又はスクリーニングキットを使用してスクリーニングすることにより得られる、IP-10 産生制御化合物；

〔13〕 IP-10 、該遺伝子又は該RNA に存在し、IP-10 の活性又は発現を変化させうる変異部位の存在を検知するためのものであることを特徴とするIP-10 関連疾患用遺伝子診断薬；

〔14〕 IP-10 遺伝子、mRNA、hnRNA から選ばれたものに存在しうる変異部位を特異的に認識できる制限酵素及びそのアイソシゾマー並びにIP-10 遺伝子、mRNA、hnRNA から選ばれたものに存在しうる変異部位を含む領域を遺伝子増幅するために利用されるオリゴヌクレオチドプライマーから成る群から選ばれたものを使用することを特徴とする上記〔13〕記載の診断薬；及び

〔15〕 工程(a):核酸試料を得る工程、

工程(b):工程(a) にて得られた核酸試料を遺伝子増幅して、IP-10 遺伝子に存在しうる変異部位を含む領域が増幅された核酸断片を得る工程、及び

工程(c):工程(b) の核酸断片について、変異の存在を調べる工程を含むことを特徴とするIP-10 遺伝子関連疾患の遺伝子診断法を提供する。

さらなる態様では、本発明は

〔16〕 被検試料におけるIP-10 ポリヌクレオチドの存在量を試験し、IP-10 ポリヌクレオチドの存在量を指標に使用して、被検体における以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性

の程度を判定又は診断することを特徴とする被検体における生物活性の判定又は診断方法；

〔17〕 被検試料におけるIP-10 タンパク質の存在量を試験し、IP-10 タンパク質の存在量を指標に使用して、被検体における以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性

の程度を判定又は診断することを特徴とする被検体における生物活性の判定又は診断方法；

〔18〕 IP-10ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含有する組成物であって、被検体における以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性

の程度を判定又は診断するために使用するものであることを特徴とする被検体における生物活性の判定又は診断組成物；

〔19〕 (i) IP-10ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド、又は(ii) IP-10ポリヌクレオチドを備え、被検体における以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性

の程度を判定又は診断するために使用するものであることを特徴とする核酸アレイ；

〔20〕 IP-10ポリヌクレオチドをPCR 増幅し、被検体における以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性

の程度を判定又は診断するために使用するものであることを特徴とするプライマーセット；

[21] 少なくとも以下の要素：

IP-10 を認識する抗体

からなるキットであって、被検体における以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性

の程度を判定又は診断するために使用するものであることを特徴とする被検体における生物活性の判定又は診断キット；

[22] 少なくとも以下の要素：

(a) 固相化したIP-10 を認識する抗体；および

(b) 標識化した且つ上記抗体とは異なるエピトープと結合する抗体

からなるキットであって、被検体における以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性

の程度を判定又は診断するために使用するものであることを特徴とする被検体における生物活性の判定又は診断キット；

[23] すくなくとも以下の工程：

(a) 被検体の生体試料をIP-10 を認識する抗体を固定化した担体と接触する工程；

(b) 該生体試料と接触せしめた固相担体を洗滌する工程；

(c) 該生体試料と接触せしめた固相担体を標識化した且つ上記抗体とは異なるエピトープと結合する抗体と接触する工程；

(d) 固相化された標識あるいは遊離である標識を測定する工程；

(e) 工程(d) で測定された標識量をIP-10 量の指標とし、正常な生体試料の結果と比較する工程；および

(f) 正常な生体試料と比較して有意に相違するIP-10 タンパク質存在量を、以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠

促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性における異常又はそのリスクの程度を示す指標として使用する工程

を含むことを特徴とする当該生物活性に伴う異常又はそのリスクの程度を測定する方法；

[24] すくなくとも以下の工程：

- (a) 被検体の生体試料よりRNA を調製する工程；
- (b) 工程(a) で調製されたRNA を電気泳動分離する工程；
- (c) 工程(b) で分離されたRNA をIP-10 ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下で標識ヌクレオチドプローブとハイブリダイズする工程；
- (d) 工程(c) でハイブリダイズしている標識量をIP-10 ポリヌクレオチド発現量の指標とし、正常な生体試料の結果と比較する工程；および
- (e) 正常な生体試料と比較して有意に相違するIP-10 ポリヌクレオチド発現量を、以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性における異常又はそのリスクの程度を示す指標として使用する工程

を含むことを特徴とする当該生物活性に伴う異常又はそのリスクの程度を測定する方法；

[25] すくなくとも以下の工程：

- (a) 被検体の生体試料よりRNA を調製する工程；
- (b) 工程(a) で調製されたRNA を鋳型にdTプライマーを使用して第1鎖cDNAを調製する工程；
- (c) 工程(b) で調製されたcDNAを鋳型にIP-10 ポリヌクレオチドをPCR 増幅するためのプライマーセットを使用してPCR 増幅する工程；
- (d) 工程(c) で得られたPCR 産物を電気泳動分離する工程；
- (e) 工程(d) で分離されたPCR 産物をIP-10 ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする標識ヌクレオチドプローブとハイブリダイズ

する工程；

(f) 工程(e) でハイブリダイズしている標識量をIP-10 ポリヌクレオチド発現量の指標とし、正常な生体試料の結果と比較する工程；および

(g) 正常な生体試料と比較して有意に相違するIP-10 ポリヌクレオチド発現量を、以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性における異常又はそのリスクの程度を示す指標として使用する工程

を含むことを特徴とする当該生物活性に伴う異常又はそのリスクの程度を測定する方法；

[26] すくなくとも以下の工程：

(a) 被検体の生体試料を組織固定化処理に付す工程；

(b) 工程(a) で調製された組織固定化標本を切片とする工程；

(c) 切片化した組織をIP-10 を認識する抗体による免疫組織染色に付す工程；

(d) 被検体の生体試料における免疫組織染色の程度を、健常のもののそれらと比較する工程；および

(e) 正常な生体試料と比較して有意に相違するIP-10 タンパク質存在量を、以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性における異常又はそのリスクの程度を示す指標として使用する工程

を含むことを特徴とする当該生物活性に伴う異常又はそのリスクの程度を測定する方法；

[27] 以下の工程：

(a) IP-10 ポリヌクレオチドをPCR 増幅するためのプライマーセットを使用し被検体の生体試料をPCR 増幅する工程；

(b) (i) IP-10 ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイ

ズするオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド、又は(ii) IP-10ポリヌクレオチドを備えた核酸アレイを使用した分析に被検体の生体試料から分離した核酸分画をかける工程；

(c) IP-10 ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドと被検体の生体試料から分離した核酸分画とをハイブリダイズする工程

から成る群から選ばれた工程のすくなくとも一つを含み、且つ被検体の生体試料におけるIP-10 ポリヌクレオチドの存在量を試験し、IP-10 ポリヌクレオチドの存在量が健常のものそれらと比較することを含むことを特徴とする、以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性における異常又はそのリスクの程度を測定する方法；

〔28〕 定量的にIP-10 タンパク質存在量又はIP-10 ポリヌクレオチド発現量を測定することを特徴とする上記〔23〕～〔27〕のいずれかーに記載の、以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性における異常又はそのリスクを測定する方法；

〔29〕 上記〔23〕～〔27〕のいずれかーに記載の、以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性における異常又はそのリスクを測定する方法において使用する、(i) IP-10を認識する抗体、(ii) 該抗体(i) とは異なるエピトープと結合する抗体、(iii) 固相化した抗体(i) 又は(ii)及び(iv)標識した抗体(i) 又は(ii)のいずれかーに記載の抗体を含有することを特徴とする試薬；

〔30〕 IP-10 を認識する抗体を使用し、検体試料中のIP-10 タンパク質量又はIP-10 ポリヌクレオチド発現量を測定することを特徴とする以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性における異常又はそのリスクの程度を測定又は診断する方法；及び

〔31〕 IP-10 を認識する抗体を含有し、検体試料中のIP-10 タンパク質量又はIP-10 ポリヌクレオチド発現量を測定し、以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性における異常又はそのリスクの程度を測定又は診断するためのものであることを特徴とする測定又は診断試薬を提供する。

本発明のその他の目的、特徴、優秀性及びその有する観点は、以下の記載より当業者にとっては明白であろう。しかしながら、以下の記載及び具体的な実施例等の記載を含めた本件明細書の記載は本発明の好ましい態様を示すものであり、説明のためにのみ示されているものであることを理解されたい。本明細書に開示した本発明の意図及び範囲内で、種々の変化及び／又は改変（あるいは修飾）をなすことは、以下の記載及び本明細書のその他の部分からの知識により、当業者には容易に明らかであろう。本明細書で引用されている全ての特許文献及び参考文献は、説明の目的で引用されているもので、それらは本明細書の一部としてその内容はここに含めて解釈されるべきものである。

#### 図面の簡単な説明

図1は、ヒツジIP-10 の塩基配列及びそれから推定されるアミノ酸配列を示す。

図2は、ヒツジ、ヤギ、ヒト及びマウスのIP-10 のアミノ酸配列を比較して示した図である。これらの動物の間では、4個のシステイン残基が保存されている

が、N 末端側の 2 個のシステイン残基の前に位置するグルタミン-ロイシン-アルギニン(BLR)モチーフはそこには存在していないことがわかる。ヒツジ IP-10 は、マウス IP-10 よりヒト IP-10 に対しより高い同一性を示している (表 1)。

図 3 は、着床期のヒツジ子宮における IP-10 mRNA の発現レベルをノーザンブロット解析して調べた結果を示す電気泳動写真を左側に示す。右側は、IP-10 mRNA についてのノーザンブロット解析を濃度解析した結果をグラフで示すものである。

図 4 は、CXCR3 mRNA、G3PDH mRNA を妊娠ヒツジ子宮につき半定量的 PCR で調べた結果を示す電気泳動写真を左側に示す。右側は、CXCR3 mRNA と G3PDH mRNA の半定量的 PCR 産物についての濃度解析した結果をグラフで示すものである。

図 5 は、着床期の間のヒツジの胚仔と子宮における IFN- $\tau$  と IFN- $\gamma$  mRNA の量を示す。左側(A) は、妊娠ヒツジの胚仔における IFN- $\tau$  mRNA のノーザンブロット解析の結果を示す。右側(B) には、ヒツジ子宮及び胚仔における IFN- $\gamma$  mRNA と G3PDH mRNA の半定量的 PCR の結果を示す電気泳動写真が示され、右下側は、濃度解析した結果をグラフで示すものである。

図 6 は、ヒツジ子宮及び胚仔組織切片における IP-10 及び IFN- $\gamma$  についての免疫組織化学解析の結果を示す生物組織の写真である。図中、le は管腔上皮、ge は腺上皮、st は上皮下間質、tr は栄養膜 (トロホブラスト) 細胞を示す。スケールバーは 100  $\mu$ m を示す。

図 7 は、ヒツジ子宮における IP-10 についての in situ ハイブリダイゼーション解析の結果を示す生物組織の写真である。図中、le は管腔上皮、ge は腺上皮、st は上皮下間質、tr は栄養膜 (トロホブラスト) 細胞を示す。スケールバーは写真 a, c 及び d については 40  $\mu$ m、写真 b については 10  $\mu$ m を示す。

図 8 は、A は IFN 類が IP-10 mRNA の量に及ぼす効果を調べた結果を示す電気泳動の写真である。B は、発情周期中の雌ヒツジからの子宮内膜移植片について IFN 類が IP-10 mRNA の量に及ぼす効果を調べた結果の電気泳動の写真である。B の左側は、特定の量の IFN 類で刺激した時の子宮内膜移植片での IP-10 mRNA についてのノーザンブロット解析の結果を示す電気泳動写真である。B の右側は、IP-10 mRNA 及び G3PDH mRNA についてのノーザンブロットを濃度解析した結果をグラフで示すものである。C は、IFN 類により刺激された子宮内膜移植片の培養培地中



のIP-10 につきウェスタンブロット解析した結果の電気泳動の写真である。

図9は、IFN- $\tau$ で刺激された子宮内膜培養培地及び組換えIP-10 のPBMCの移動活性への影響を調べた結果を示す。A は組換えヤギIP-10 (rcIP-10) についてのウェスタンブロットの結果、B はPBMCにおけるCXCR3 mRNAのノーザンブロットの結果、C はIFN- $\tau$ 処理及び非処理子宮内膜培養培地、及びrcIP-10 のPBMCの移動、D は抗IP-10 抗体の存在下におけるIFN- $\tau$ またはrcIP-10 刺激子宮内膜培養培地のPBMC移動を示す。

図10は、組換えヤギIP-10タンパク質及びそれに対する抗体の作製について調査した結果を示す。A は、組換えヤギIP-10(rcIP-10)を大腸菌BL21-SI で発現し、その細胞溶解物をSDS-PAGEにかけた結果を示すものである。レーン1は、ニッケルキレートカラムによる精製前のものを、レーン2は、精製後のものを示す。B は、精製rcIP-10 タンパク質のウェスタンブロット分析の結果を示す。レーン1は、抗-His-Tag抗体の結果、レーン2は、抗-ヤギIP-10 抗体の結果を示す。C の左側は、CXCR3 mRNAについてのノーザンブロット分析の結果を示す。RNA は、pcDNA3.1-ヤギCXCR3 により一過性にトランスフェクトされたKU-1細胞から抽出されたもの(CXCR3)或いは親のベクターpcDNA3.1でトランスフェクトされたKU-1細胞から抽出された(Mock)。C の右側は、CXCR3 をトランスフェクトしたKU-1細胞に対するrcIP-10 の生物学的活性をケモタキシスアッセイにより調べた結果を示す。○は、CXCR3 を発現しているもので、□は、CXCR3 を発現していないものである。D は、rcIP-10 を添加したKU-1細胞におけるケモタキシスアッセイの結果を示す。anti IP-10は、抗-ヤギIP-10 抗体で前処理してある場合を、ーは、抗体による処理の一切ない場合を、そしてcontrol IgGは、コントロールのウサギIgG で前処理した場合を示している。

図11は、妊娠初期におけるヤギ子宮内IP-10の発現について調査した結果を示す。A は、ヤギ胚仔由来の培養培地中のIFN- $\tau$ の存在をウェスタンブロット分析した結果を示す。D14 は、妊娠14日目ヤギ胚仔由来の培養培地、D17 は、妊娠17日目のもの、そしてD20 は、妊娠20日目のものである。B は、子宮内膜IP-10 mRNAのノーザンブロットの結果を示す。パネル左は、妊娠ヤギからのRNA で、パネル右は、rcIFN- $\tau$ で刺激された発情周期ヤギからのRNA である。C の左側は、

発情周期及び妊娠のヤギ子宮フラッシング培地中のIP-10 のウェスタンブロット分析の結果を示す。C の右側は、IP-10 のウェスタンブロットの濃度解析結果を示す。D は、ヤギ子宮におけるIP-10 mRNAのin situ ハイブリダイゼーションの結果を示す。

図12は、ヤギ胚仔におけるCXCR3の発現と細胞内局在について調査した結果を示す。A は、RT-PCRによりCXCR3 mRNAの発現レベルを調べた結果を示す。B は、ノーザンブロット分析によりCXCR3 mRNAの発現を調べた結果を示す。C は、抗-CXCR3抗体を用いてのCXCR3 発現について、免疫蛍光検査分析した結果を示す。

図13は、ヤギトロホblast細胞へのrcIP-10の結合について調査した結果を示す。A は、組換えタンパク質のビオチン化効率を調べた結果を示す。B は、IP-10 レセプターCXCR3 mRNA及びリンフォクチンレセプターXCR1 mRNA の発現をRT-PCRにより分析した結果を示す。C は、ビオチン化したタンパク質を妊娠17日目のヤギ胚仔と反応させ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンで可視化した結果を示す。

図14は、CXCR3を発現している胚仔細胞に対する組換えcIP-10の遊走活性刺激について調査した結果を示す。A の左側は、HTS-1から抽出したRNAのノーザンブロットの結果を示している。A の右側は、HTS-1のケモタキシスアッセイの結果を示している。B は、CXCR3発現プラスミドでトランスフェクトしたHTS-1の遊走活性に対するrcIP-10 の作用について調査した結果を示す。C は、妊娠17日目のCXCR3を発現している初代トロホblast細胞についてケモタキシスアッセイを行った結果を示す。

図15は、フィブロネクチン及び子宮内膜上皮細胞へのトロホblast細胞の接着性に及ぼすrcIP-10の影響について調査した結果を示す。A は、ヤギトロホblast細胞（妊娠17日目）の接着性につき、rcIP-10 で活性化した場合の効果を試験した結果を示す。B は、トロホblast細胞のフィブロネクチンへの接着性に及ぼすrcIP-10 の作用を調べた結果を示す。C は、ヤギCXCR3 発現ベクターを導入したHTS-1 細胞について、フィブロネクチンへの接着性に及ぼすrcIP-10 の作用を調べた結果を示す。D は、ヤギCXCR3 発現ベクターを導入したHTS-1 細胞について、子宮内膜上皮細胞に及ぼすrcIP-10 の作用を調べた結果を示す。

図16は、組換えcIP-10により活性化されたヤギトロホプラスト細胞におけるインテグリンサブユニットの発現について調査した結果を示す。上側は、ヤギCXCR3 発現ベクターを導入したHTS-1 細胞について、インテグリンサブユニット： $\alpha$ 5、 $\alpha$ V、 $\beta$ 1、 $\beta$ 3及び $\beta$ 5 mRNA をRT-PCRにより分析した結果を示す。IP10 +Abs: 組換えcIP-10(20 ng/ml)+抗-IP-10抗体(30  $\mu$ g/ml)による前処理、IP10 : 組換えcIP-10(20 ng/ml)。下側は、PCR 産物をデンシオメトリック分析した結果を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本明細書において「IP-10」とは、インターフェロン・ガンマで誘起される10 kDaのタンパク質(interferon- $\gamma$  inducible protein 10 kDa, IP-10)を指している。本タンパク質因子は、主に白血球のサブセットに対するケモタクティック活性を介して炎症応答並びに免疫応答の多くの局面を制御しているケモカインファミリーの一員であるものを指してよい。IP-10は、マウス及びヒトにおける研究からC-X-C ケモカイン類の一員であり、例えばマクロファージ、線維芽細胞、星状(アストロサイト)細胞、ケラチノサイト細胞、上皮細胞、内皮細胞などを含めた様々なタイプの細胞において誘導されていることの知られたものであってよい。該IP-10はC-X-C 型ケモカインのレセプター3(CXCR3)を介して優先的にNK細胞並びにTh1表現型の活性化されたT細胞を標的としているものであってよい。

本発明では、特にヒツジIP-10を同定して、その特徴的な着床期における活性が認識されることになっていることから、こうした特性という点では有蹄動物のIP-10のいかなるものを包含しているものであってよい。また、その着床期における活性を利用する観点からは、ヒトIP-10及びその誘導體、類縁体、等価物などを包含してよい。

ヒツジIP-10は、102個のアミノ酸残基からなるペプチドであり、その中には4個のシステイン残基が存在する。当該4個のシステイン残基は、ケモカインファミリーにおいて保存され、その最初の2個のシステイン残基は一個のアミノ酸

残基により分けられてC-X-C型のモチーフを形成していることが認められるが、他の動物のものと同様にヒツジIP-10 は、該最初の2個のシステイン残基よりも前に位置するグルタミン-ロイシン-アルギニン(BLR) モチーフを欠いており、ヒトIP-10 と高い類似性、すなわちそれぞれヌクレオチド配列では82.7% 及びアミノ酸配列では75.5% の相同性を示していることを特徴としている。本発明のヒツジIP-10 を含めたIP-10 は、(1) 胚遊走活性、(2) 胚の子宮壁への着床促進活性、(3) 不妊治療作用、(4) 妊娠促進活性、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性を有することが挙げられる。

典型的には、本発明のヒツジIP-10 やヤギIP-10 を含めたIP-10 は、生体内に存在する天然型ペプチド（内在性ペプチドあるいは内因性ペプチド）であってよい。本発明の代表的なIP-10 としては、配列表の配列番号:1のDNA でコードされて産生されるポリペプチド、例えば配列表の配列番号:2のアミノ酸配列またはそれと実質的に同等なアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられる。また、本発明の代表的なIP-10 は、配列表の配列番号:2のアミノ酸配列のうちの少なくとも1~102 個の連続したアミノ酸残基を有し且つ(1) 胚遊走活性、(2) 胚の子宮壁への着床促進活性、(3) 不妊治療作用、(4) 妊娠促進活性、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性を有するもの、あるいはそれらの特徴を有し且つ配列表の配列番号:2のアミノ酸配列に対し少なくとも60% の相同性、より好ましくは75.5% より大きい相同性、またある場合には82.7% より大きい相同性、さらに好適には90% 以上の相同性、または95% 以上の相同性を有するものなどが挙げられる。特に好ましくは、新規なものが挙げられる。

本発明の「ポリペプチド」としては、特にはIP-10 及びその関連ポリペプチド、特にはヒツジIP-10 やヤギIP-10 を含めた有蹄動物由来のIP-10 を包含する。該IP-10 及びその関連ポリペプチドとしては、妊娠に関連して着床期における活性を利用する観点からは、ヒト由来のものが挙げられてよい。例えばヒツジIP-1

0 が挙げられ、代表的には、配列表の配列番号：2 で表されるアミノ酸配列のうち、少なくとも60% より高い相同性、好ましくは70% 以上の相同性、さらに好ましくは80% 以上の相同性、また好ましくは85% 以上の相同性、もっと好ましくは90% 以上の相同性、より好ましくは95% 以上の相同性、特に好ましくは97% 以上の相同性を有し且つ(1) 胚遊走活性、(2) 胚の子宮壁への着床促進活性、(3) 不妊治療作用、(4) 妊娠促進活性、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた活性あるいは同等の抗原性などといった実質的に同等の生物学的活性を有するアミノ酸配列を有するものがすべて挙げられる。

本発明のIP-10 としては、妊娠に関連して着床期における活性を利用する観点からは、ヒト由来IP-10、ヒツジやヤギなどの有蹄動物由来のIP-10 あるいはそこに存在する特徴あるドメインやモチーフあるいはその一部を有し且つ新規なアミノ酸配列を有するものも含まれてよい。より好ましくは、本発明のペプチドとしては、妊娠に関連して着床期における上記したような活性を持つもので、各IP-10 ファミリーと少なくとも60% より高い相同性を持つアミノ酸配列を有するものが挙げられる。代表的には、本発明のペプチドは、配列表の配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と実質的に同等のアミノ酸配列を有するものからなる群から選ばれたものである。さらに本発明のペプチドとしては、配列表の配列番号：2 で表されるアミノ酸配列の一部または全部を有していてもよい。こうした配列を有するものはすべて包含されてよい。

本明細書中、「相同性」とは、ポリペプチド配列（あるいはアミノ酸配列）又はポリヌクレオチド配列（あるいは塩基配列）における2本の鎖の間で該鎖を構成している各アミノ酸残基同士又は各塩基同士の互いの適合関係において同一であると決定できるようなものの量（数）を意味し、二つのポリペプチド配列又は二つのポリヌクレオチド配列の間の配列相関性の程度を意味するものである。相同性は容易に算出できる。二つのポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列間の相同性を測定する方法は数多く知られており、「相同性」（「同一性」とも言

われる)なる用語は、当業者には周知である(例えば、Lesk, A. M. (Ed.), Computational Molecular Biology, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, D. W. (Ed.), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Academic Press, New York, (1993); Griffin, A. M. & Griffin, H. G. (Ed.), Computer Analysis of Sequence Data: Part I, Human Press, New Jersey, (1994); von Heinje, G., Sequence Analysis in Molecular Biology, Academic Press, New York, (1987); Gribskov, M. & Devereux, J. (Ed.), Sequence Analysis Primer, M-Stockton Press, New York, (1991)等)。二つの配列の相同性を測定するのに用いる一般的な方法には、Martin, J. Bishop (Ed.), Guide to Huge Computers, Academic Press, San Diego, (1994); Carillo, H. & Lipman, D., S IAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988)等)に開示されているものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。相同性を測定するための好ましい方法としては、試験する二つの配列間の最も大きな適合関係部分を得るように設計したものが挙げられる。このような方法は、コンピュータプログラムとして組み立てられているものが挙げられる。二つの配列間の相同性を測定するための好ましいコンピュータプログラム法としては、GCG プログラムパッケージ (Devereux, J. et al., Nucleic Acids Research, 12(1): 387 (1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA (Atschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215: 403 (1990))等が挙げられるが、これらに限定されるものでなく、当該分野で公知の方法を使用することができる。

本発明で対象とするポリペプチドあるいはタンパク質をコードする核酸は、妊娠に関連して着床期における上記したような活性を利用する観点からは、IP-10 及びその関連ポリペプチド及びその一部の連続したアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するもの、ヒツジやヤギなどの有蹄動物由来のIP-10 及びその関連ポリペプチド及びヒト由来のIP-10 及びその関連ポリペプチド並びにその一部の連続したアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するもの、ある代表的な場合には、配列表の配列番号: 2 で表されるペプチド及びその一部の連続したアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するもの、例えば、配列表の配列番号: 1 で

表される塩基配列の少なくとも63-365位により構成される塩基配列を含有するもの、及び配列表の配列番号：1で表される塩基配列の60-62位のATGから366-368位のTAAより構成される塩基配列を含有するもの（終止コドンTAAは、TGAまたはTAGであってもよい）であることができるし、塩基配列に開始コドン（Metをコードするコドン）及び終止コドンを付加したもの、また、該塩基配列がコードするタンパク質と少なくとも80%、85%、90%、95%、あるいは98%の相同性を有するアミノ酸配列を持ち且つ配列表の配列番号：2のアミノ酸配列のうちの少なくとも1~16個の連続したアミノ酸残基を有し、尚且つ（1）胚遊走活性、（2）胚の子宮壁への着床促進活性、（3）不妊治療作用、（4）妊娠促進活性、（5）胚仔と母体との間の相互作用調整活性、（6）免疫細胞遊走活性、及び（7）子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた活性を有するかあるいは同等の抗原性などのそれと実質的に同等の生物学的活性を有するペプチドをコードするといったそれと同効の塩基配列を含有するものであれば如何なるものであってもよい。該IP-10をコードする核酸は、一本鎖DNA、二本鎖DNA、RNA、DNA:RNAハイブリッド、合成DNAなどの核酸であり、またヒツジ、ヤギあるいはヒトゲノムDNA、ヒツジ、ヤギあるいはヒトゲノミックDNAライブラリー、ヒツジあるいはヒト組織・細胞由来のcDNA、合成DNAのいずれであってもよい。該IP-10をコードする核酸の塩基配列は、修飾（例えば、付加、欠失、置換など）されることもでき、そうした修飾されたものも包含されてよい。さらには、以下説明するように、本発明の核酸は、本発明のペプチドあるいはその一部をコードするものであってよく、好ましいものとしてはDNAが挙げられる。また上記「同効の塩基配列」とは、例えばストリンジェント(stringent)な条件下で配列表の配列番号：1の塩基配列のうちの連続した5個以上の塩基配列、好ましくは10個以上の塩基配列、より好ましくは15個以上の塩基配列、さらに好ましくは20個以上の塩基配列とハイブリダイズし、該IP-10と実質的に同等のアミノ酸配列をコードするものなどが挙げられる。ストリンジェントな条件とは、所定のポリヌクレオチドとオリゴヌクレオチドプローブ又はポリヌクレオチドプローブとの選択的かつ検出可能な特異的結合を可能とする条件である。ストリンジェント条件は、塩濃度、有機溶媒（例えば、ホルムアミドなど）、温度、およびその他の公知の条件によって定義

される。すなわち、塩濃度を減じるか、有機溶媒濃度を増加させるか、またはハイブリダイゼーション温度を上昇させるかによってストリンジェンシー(stringency)は増加する。例えば、ストリンジェントな塩濃度は、通常、NaCl約750 mM以下およびクエン酸三ナトリウム約75 mM以下、より好ましくはNaCl約500 mM以下およびクエン酸三ナトリウム約50 mM以下、最も好ましくはNaCl約250 mM以下およびクエン酸三ナトリウム約25 mM以下である。ストリンジェントな有機溶媒濃度は、ホルムアミド約35%以上、最も好ましくは約50%以上である。ストリンジェントな温度条件は、約30°C以上、より好ましくは約37°C以上、最も好ましくは約42°C以上である。その他の条件としては、ハイブリダイゼーション時間、洗浄剤（例えば、SDSなどの界面活性剤など）の濃度、およびキャリアーDNAの存否等であり、これらの条件を組み合わせることによって、様々なストリンジェンシーを設定することができる。一つの好ましい態様としては、例えばナトリウム濃度が約19~20 mMで、かつ温度が約60~65°Cである条件が好ましく、ナトリウム濃度が約19 mMの濃度で、かつ温度が約65°Cの温度である条件が更に好ましい。

所定の遺伝子産物の確認を、当該遺伝子をトランスフェクションした、293T細胞、COS-1細胞などのそれに適した動物細胞などを用いて行うことができる。この外来遺伝子を哺乳動物などの動物細胞に導入する方法としては当該分野で知られた方法あるいはそれと実質的に同様な方法で行うことができ、例えばリン酸カルシウム法（例えば、F. L. Graham et al., *Virology*, 52: 456, 1973など）、DEAE-デキストラン法（例えば、D. Warden et al., *J. Gen. Virol.*, 3: 371, 1968など）、エレクトロポレーション法（例えば、B. Neumann et al., *EMBO J.*, 1: 841, 1982など）、マイクロインジェクション法、リボソーム法、ウイルス感染法、ファージ粒子法などが挙げられる。こうして所定の遺伝子、例えばIP-10遺伝子をトランスフェクションされた動物細胞の産生する遺伝子産物は、それを解析することもできる。

本発明で得られたDNAなど（例えば、IP-10遺伝子など）を組込むプラスミドとしては遺伝子工学的に常用される宿主細胞（例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞宿主、酵母、CHO細胞、COS細胞等の真核細胞宿主、Sf21等の昆虫細胞宿主



）中で該DNAが発現できるプラスミドであればどのようなプラスミドでもよい。こうした配列内には、例えば選択した宿主細胞で発現するのに好適に修飾されたコドンが含まれていることができるし、制限酵素部位が設けられていることもできるし、目的とする遺伝子の発現を容易にするための制御配列、促進配列など、目的とする遺伝子を結合するのに役立つリンカー、アダプターなど、さらには抗生物質耐性などを制御したり、代謝を制御したりし、選別などに有用な配列（ハイブリドタンパク質や融合タンパク質をコードするものも含む）等を含んでいることができる。好ましくは、適当なプロモーター、例えば大腸菌を宿主とするプラスミドでは、トリプトファンプロモーター(trp)、ラクトースプロモーター(lac)、トリプトファン・ラクトースプロモーター(tac)、リポプロテインプロモーター(lpp)、 $\lambda$ ファージ  $P_L$  プロモーター等を、動物細胞を宿主とするプラスミドでは、SV40レートプロモーター、MMTV LTRプロモーター、RSV LTRプロモーター、CMVプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター等を、酵母を宿主とするプラスミドでは、GAL1、GAL10プロモーター等を使用し得る。

大腸菌を宿主とするプラスミドとしては、例えばpBR322、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119、pSP64、pSP65、pTZ-18R/-18U、pTZ-19R/-19U、pGEM-3、pGEM-4、pGEM-3Z、pGEM-4Z、pGEM-5Zf(-)、pBluescript KS<sup>TM</sup> (Stratagene)などが挙げられる。大腸菌での発現に適したプラスミドベクターとしては、pAS、pKK223 (Pharmacia)、pMC1403、pMC931、pKC30、pRSET-B (Invitrogen)なども挙げられる。動物細胞を宿主とするプラスミドとしては、SV40ベクター、ポリオーマ・ウイルスベクター、ワクシニア・ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが挙げられ、例えばpcD、pcD-SR $\alpha$ 、CDM8、pCEV4、pME18S、pBC12BI、pSG5 (Stratagene)などが挙げられる。酵母を宿主とするプラスミドとしては、YIp型ベクター、YEp型ベクター、YRp型ベクター、YCp型ベクターなどが挙げられ、例えばpGPD-2などが挙げられる。宿主細胞としては、宿主細胞が大腸菌の場合、例えば大腸菌K12株に由来するものが挙げられ、例えばNM533、XL1-Blue、C600、DH1、DH5、DH11S、DH12S、DH5 $\alpha$ 、DH10B、HB101、MC1061、JM109、STBL2、B834株由来としては、BL21(DE3)pLysSなどが挙げられる。宿

主細胞が動物細胞の場合、例えばアフリカミドリザル線維芽細胞由来のCOS-7細胞、COS-1細胞、CV-1細胞、マウス線維芽細胞由来のCOP細胞、MOP細胞、WOP細胞、チャイニーズ・ハムスター細胞由来のCHO細胞、CHO DHFR<sup>-</sup>細胞、ヒトHeLa細胞、マウス細胞由来C127細胞、マウス細胞由来NIH 3T3細胞などが挙げられる。昆虫細胞としては、カイコ核多角体病ウイルス (Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus) あるいはそれに由来するものをベクターとし、カイコ幼虫あるいはカイコ培養細胞、例えばBM-N細胞などを用いることが挙げられる。植物細胞を宿主細胞として使用することも可能であり、それに適するベクターと共に、それらは当該分野で広く知られている。本発明の遺伝子工学的手法においては、当該分野で知られたあるいは汎用されている制限酵素、逆転写酵素、DNA断片をクローン化するのに適した構造に修飾したりあるいは変換するための酵素であるDNA修飾・分解酵素、DNAポリメラーゼ、末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼ、DNAリガーゼなどを用いることが出来る。DNA遺伝子をクローニングしてDNAライブラリーを構築するのに適したベクターとしては、プラスミド、λファージ、コスミド、P1ファージ、F因子、YACなどが挙げられ、好ましくはλファージ由来のベクターが挙げられ、例えばCharon 4A、Charon 21A、λgt10、λgt11、λDASHII、λFIXII、λEMBL3、λZAPII<sup>TM</sup> (Stratagene) などが挙げられる。

本発明のタンパク質をコードする核酸を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体は、必要に応じて適当な選択マーカーを用い、繰り返しクローニングを行うことにより、高い発現能を安定して有する細胞株を得ることができる。例えば、宿主細胞として動物細胞を用いた形質転換体において、dhfr遺伝子を選択マーカーとして利用した場合、MTX濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、本発明のタンパク質をコードするDNAを増幅させ、より高い発現を得られる細胞株を得ることができる。本発明の形質転換体は、本発明のタンパク質をコードする核酸が発現可能な条件下で培養し、目的物を生成、蓄積せしめることができる。該形質転換体は、当該分野で汎用されている培地中で培養することができる。例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞宿主、酵母などを宿主としている形質転換体は、液体培地を好適に使用することができる。培地中には、

該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、麦芽エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム、炭酸カルシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、カザミノ酸、生長促進因子などを添加してもよい。また、必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、 $3\beta$ -インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。培地のpHは約5～8が望ましい。

培養は、例えば大腸菌では通常約15～約45℃で約3～約75時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5～約20%の胎児牛血清を含むMEM 培地、PRMI1640培地、DMEM培地などが用いられる。pHは約6～約8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～約40℃で約15～約72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。上記培養細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により粗抽出液を得る方法などを適宜用いることができる。緩衝液の中には尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白変性剤や、Triton X-100（商品名）、Tween-80（商品名）などの界面活性剤を加えてあってもよい。培養液中に目的生成物が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる目的生成物は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせてその精製を行なうことができ、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、例えばジエチルアミノエチル基あるいはカルボキシメチル基などを持つ担体などを用いたイオン交換クロマトグラフィー法、例えばブチル基、オクチル基、フェニル基など疎水性基を持つ担体などを用いた疎水性クロマ

トグラフィー法、色素ゲルクロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製して得ることができる。好ましくは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、リガンドなどを固定化したアフィニティ・クロマトグラフィーなどで処理し精製分離処理できる。例えば、ゼラチン-アガロース・アフィニティ・クロマトグラフィー、ヘパリン-アガロース・クロマトグラフィーなどが挙げられる。

さらに、本発明に係わる所定の遺伝子塩基配列を基に遺伝子工学的に常用される方法を用いることにより、IP-10（例えばヒトIP-10、ヒツジIP-10、ヤギIP-10など）のアミノ酸配列中に適宜、1個ないし複数個以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、転移あるいは付加したとき変異を導入した相当するタンパク質を製造することができる。こうした変異・変換・修飾法としては、日本生化学会編、「続生化学実験講座1、遺伝子研究法II」、p105（広瀬進）、東京化学同人（1986）；日本生化学会編、「新生化学実験講座2、核酸III（組換えDNA技術）」、p233（広瀬進）、東京化学同人（1992）；R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 154, p. 350 & p. 367, Academic Press, New York (1987)；R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100, p. 457 & p. 468, Academic Press, New York (1983)；J. A. Wells et al., Gene, 34: 315, 1985；T. Grundstroem et al., Nucleic Acids Res., 13: 3305, 1985；J. Taylor et al., Nucleic Acids Res., 13: 8765, 1985；R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 155, p. 568, Academic Press, New York (1987)；A. R. Oliphant et al., Gene, 44: 177, 1986などに記載の方法が挙げられる。例えば合成オリゴヌクレオチドなどを利用する位置指定変異導入法（部位特異的変異導入法）（Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10: 6487, 1987；Carter et al., Nucl. Acids Res., 13: 4331, 1986）、カセット変異導入法（cassette mutagenesis: Wells et al., Gene, 34: 315, 1985）、制限部位選択変異導入法（restriction selection mutagenesis: Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 317: 415, 1986）、アラニン・スキャンニング法（Cunningham & Wel

ls, Science, 244: 1081-1085, 1989), PCR 変異導入法, Kunkel法, dNTP[ $\alpha$ S]法 (Eckstein), 亜硫酸や亜硝酸などを用いる領域指定変異導入法等の方法が挙げられる。

さらに得られた本発明のタンパク質（あるいはペプチド）は、化学的な手法でその含有されるアミノ酸残基を修飾することもできるし、ペプチダーゼ、例えばペプシン、キモトリプシン、パパイン、ブロメライン、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼなどの酵素を用いて修飾したり、部分分解したりしてその誘導体などにすることができる。本発明のタンパク質は、C末端が通常カルボキシル基(-COOH) またはカルボキシレート (-COO<sup>-</sup>) であるが、C末端がアミド(-CONH<sub>2</sub>) またはエステル(-COOR)であってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC<sub>3-8</sub> シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどのC<sub>6-12</sub> アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C<sub>1-2</sub>アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル-C<sub>1-2</sub> アルキル基などのC<sub>7-14</sub> アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。本発明のタンパク質が C末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のタンパク質には、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC<sub>1-5</sub>アルキル-カルボニル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミル化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-COOH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が

結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。また遺伝子組換え法で製造する時に融合タンパク質として発現させ、生体内あるいは生体外で天然のIP-10 と実質的に同等の生物学的活性を有しているものに変換・加工してもよい。遺伝子工学的に常用される融合産生法を用いることができるが、こうした融合タンパク質はその融合部を利用してアフィニティ・クロマトグラフィーなどで精製することも可能である。こうした融合タンパク質としては、ヒスチジンタグに融合せしめられたもの、あるいは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -gal)、マルトース結合タンパク (MBP)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、チオレドキシン (TRX) 又は Cre Recombinase のアミノ酸配列に融合せしめられたものなどが挙げられる。同様に、ポリペプチドは、ヘテロジーニアスなエピトープのタグを付加され、該エピトープに特異的に結合する抗体を用いてのイムノアフィニティ・クロマトグラフィーによる精製をなし得るようにすることもできる。より適した実施態様においては、該エピトープタグとしては、例えば AU5, c-Myc, CruzTag 09, CruzTag 22, CruzTag 41, Glu-Glu, HA, Ha.11, KT3, FLAG (registered trademark, Sigma-Aldrich), Omni-probe, S-probe, T7, Lex A, V5, VP16, GAL4, VSV-G などが挙げられる。(Field et al., *Molecular and Cellular Biology*, 8: pp.2159-2165 (1988); Evan et al., *Molecular and Cellular Biology*, 5: pp.3610-3616 (1985); Paborsky et al., *Protein Engineering*, 3(6): pp.547-553 (1990); Hopp et al., *BioTechnology*, 6: pp.1204-1210 (1988); Martin et al., *Science*, 255: pp.192-194 (1992); Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 266: pp.15163-15166 (1991); Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: pp.6393-6397 (1990) など)。

さらに融合タンパク質としては、検出可能なタンパク質となるようなマーカを付されたものであることもできる。より好適な実施態様においては、該検出可能なマーカは、ビオチン/ストレプトアビジン系の Biotin Avi Tag、蛍光を発する物質などであってよい。該蛍光を発する物質としては、オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) などの発光クラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP)、それを改変した変異体 (GFP バリエント)、例えば、EGFP (Enhanced-humanized GFP), rsGFP (red-shift GFP), 黄色蛍光タンパク質 (yellow f

luorescent protein: YFP), 緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP), 藍色蛍光タンパク質 (cyan fluorescent protein: CFP), 青色蛍光タンパク質 (blue fluorescent protein: BFP), ウミシイタケ (*Renilla reniformis*) 由来のGFP などが挙げられる (宮脇敦史編、実験医学別冊ポストゲノム時代の実験講座 3-GFP とバイオイメーjing、羊土社 (2000年))。また、上記融合タグを特異的に認識する抗体 (モノクローナル抗体及びそのフラグメントを含む) を使用して検出を行うこともできる。酵母を利用した two-hybrid 法も利用できる。

本発明の対象タンパク質 (例えば、ヒト由来のIP-10、ヒツジ由来のIP-10 など) は、1個以上のアミノ酸残基が同一性の点で天然のものと異なるもの、1個以上のアミノ酸残基の位置が天然のものと異なるものであってもよいし、特徴的な着床期における活性、例えば妊娠に関連しての着床期における活性、より具体的には、(1) 胚遊走活性、(2) 胚の子宮壁への着床促進活性、(3) 不妊治療作用、(4) 妊娠促進活性、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性を有するものが挙げられる。本発明の対象タンパク質は、上記したようなヒト由来のIP-10、ヒツジ由来のIP-10 などの、特有なアミノ酸残基が1個以上 (例えば、1~80個、好ましくは1~60個、さらに好ましくは1~40個、さらに好ましくは1~20個、特には1~10個など) 欠けている欠失類縁体、特有のアミノ酸残基の1個以上 (例えば、1~80個、好ましくは1~60個、さらに好ましくは1~40個、さらに好ましくは1~20個、特には1~10個など) が他の残基で置換されている置換類縁体、1個以上 (例えば、1~80個、好ましくは1~60個、さらに好ましくは1~40個、さらに好ましくは1~20個、特には1~10個など) のアミノ酸残基が付加されている付加類縁体も包含する。天然のIP-10 の特徴であるドメイン構造あるいはレセプター結合能が維持されていれば、上記のごとき変異体は、全て本発明に包含されてもよい。また本発明の所定タンパク質は天然のIP-10 と実質的に同等の一次構造コンフォメーションあるいはその一部を有しているものも含まれてよいと考えられ、さらに天然のIP-10 と実質的に同等の生物学的活

性を有しているものも含まれてよいと考えられる。さらに天然に生ずる変異体の一つであることもできる。本発明の対象タンパク質は、例えば、配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列のうち、(1) 第2位～第102位のアミノ酸配列を有するもの、(2) 同第1位～第102位のアミノ酸配列を有するもの、及び(3) 少なくとも同第20位～第80位のアミノ酸配列を有するものからなる群から選ばれたアミノ酸配列に対し、60%、場合によっては70%より高い相同性を有しているものが挙げられ、より好ましくはそれに対し、80%あるいは90%以上の相同アミノ酸配列を有するものが挙げられる。本発明の対象タンパク質の一部のものとは、該タンパク質の一部のペプチド（すなわち、該タンパク質の部分ペプチド）であって、本発明のヒツジIP-10と実質的に同等な活性を有するものであればいずれのものであってもよい。例えば、該本発明のタンパク質の部分ペプチドは、本発明のヒツジIP-10の構成アミノ酸配列のうち少なくとも5個以上、好ましくは20個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは80個以上、もっと好ましくは90個以上、ある場合には95個以上のアミノ酸配列を有するペプチドが挙げられ、好ましくはそれらは連続したアミノ酸残基に対応するものであるか、あるいは、例えば、配列表の配列番号：2で示されるアミノ酸配列のうち対応する領域に対する相同性に関して、上記と同様の相同性を有するものが挙げられる。

本明細書において、「実質的に同等」や「実質的に同一」とは蛋白質の活性、例えば、着床期の活性、生理的な活性、生物学的な活性が実質的に同じであることを意味する。さらにまた、その用語の意味の中には、実質的に同質の活性を有する場合を包含してよく、該実質的に同質の活性としては、(1) 胚遊走の活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療作用、(4) 妊娠促進作用、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた活性などを挙げることができる。該実質的に同質の活性とは、それらの活性が性質的に同質であることを示し、例えば、生理的に、薬理学的に、あるいは生物学的に同質であることを示す。例えば、(1) 胚遊走の活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療作用、(4) 妊娠促進作用、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活



性、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた活性などの活性が、同等（例えば、約 0.001～約1000倍、好ましくは約0.01～約100 倍、より好ましくは約 0.1～約20倍、さらに好ましくは約 0.5～約2 倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的な要素は異なってもよい。次に、アミノ酸の置換、欠失、あるいは付加は、しばしばポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな変化を生ぜしめないし、あるいはプラスの変化を生ぜしめるが、こうした場合、その置換、欠失、あるいは付加を施されたポリペプチドは、所定の目的からはそうした置換、欠失、あるいは付加のされていないものと実質的に同一であるとされてよい。該アミノ酸配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換体としては、そのアミノ酸が属するところのクラスのうち他のアミノ酸類から選ぶことができる。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、トリプトファン、メチオニンなどが挙げられ、極性（中性）としては、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどが挙げられ、陽電荷をもつアミノ酸（塩基性アミノ酸）としては、アルギニン、リジン、ヒスチジンなどが挙げられ、陰電荷をもつアミノ酸（酸性アミノ酸）としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。

本発明のタンパク質及びその一部のペプチドの合成には、当該ペプチド合成分野で知られた方法、例えば液相合成法、固相合成法などの化学合成法を使用することができる。こうした方法では、例えばタンパク質あるいはペプチド合成用樹脂を用い、適当に保護したアミノ酸を、それ自体公知の各種縮合方法により所望のアミノ酸配列に順次該樹脂上で結合させていく。縮合反応には、好ましくはそれ自体公知の各種活性化試薬を用いるが、そうした試薬としては、例えばジシクロヘキシルカルボジイミドなどカルボジイミド類を好ましく使用できる。生成物が保護基を有する場合には、適宜保護基を除去することにより目的のものを得ることができる。

本発明のタンパク質及びその一部のペプチドは、それが遊離型のものとして得られた場合には、それ自体公知の方法あるいはそれに準じた方法で塩に変換する

ことができ、またそれらは塩として得られた場合には、それ自体公知の方法あるいはそれに準じた方法で遊離型のものあるいは他の塩に変換することができる。

本発明のタンパク質及びその一部のペプチドの塩としては、生理的に許容されるものあるいは医薬として許容されるものが好ましいが、これらに限定されない。こうした塩としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などの無機酸との塩、例えば酢酸、ギ酸、マレイン酸、フマル酸、コハク酸、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸などの有機酸との塩などが挙げられる。さらに該塩としては、アンモニウム塩、例えばエチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、ヒドロキシエチルアミンなどの有機塩基との塩なども挙げられる。

こうした本発明のIP-10 及びその変異体、修飾体、誘導体などは、上記で説明したような分離・精製処理を施すことができる。本発明では、「断片」、「誘導体」及び「類縁体」なる用語は、例えば、配列番号：2のポリペプチド、配列番号：1の配列から転写され且つスプライシングされていないか又は特異的にスプライシングされた hnRNA又はmRNAによりコードされるポリペプチド、又はゲノミックDNA によりコードされるポリペプチドに関連して、その「断片」、「誘導体」又は「類縁体」と称した場合、このようなポリペプチドと本質的に同一の生物学的機能又は活性を有しているポリペプチドを意味する。

本発明ではこれまで知られていなかった哺乳動物のタンパク質IP-10 の機能に関する情報を提供しているから、こうした情報を利用することも本発明に包含される。こうした利用としては、例えばIP-10 及び関連タンパク質をコードする哺乳動物、特に好ましくはヒトの、ゲノムDNA 及びcDNAの単離及び検知などをして、該IP-10 の解明された機能、例えば胚遊走活性化、胚の子宮壁への着床促進、不妊治療、妊娠効率促進、着床期に胚を子宮に誘因する活性、胚仔と母体との間の相互作用調整活性などを調べる手法や試薬の開発が挙げられる。

例えば、ヒツジIP-10 DNA 配列などのIP-10 DNA 配列をプローブとして利用して、例えばIP-10 及び関連タンパク質の機能解析、例えば胚遊走活性化、胚の子宮壁への着床促進、不妊治療、妊娠効率促進、着床期に胚を子宮に誘因する活性

、胚仔と母体との間の相互作用調整活性などが可能である。プローブは、必要に応じて、当該分野で知られた標識を付与しておくことができる。標識は、ラジオアイソトープ (RI) 法または非RI法によって行うことができるが、非RI法を用いることが好ましい。非RI法としては、蛍光標識法、ビオチン標識法、化学発光法等が挙げられるが、蛍光標識法を用いることが好ましい。蛍光物質としては、オリゴヌクレオチドの塩基部分と結合できるものを適宜に選択して用いることができるが、シアニン色素 (例えば、Cy Dye<sup>TM</sup> シリーズのCy3、Cy5等)、ローダミン6G試薬、N-アセトキシ-N<sup>2</sup>-アセチルアミノフルオレン(AAF)、AAIF(AAFのヨウ素誘導体) などを使用することができる。例えば、遺伝子の単離にあたっては、PCR 法、さらには逆転写酵素 (RT) を用いたPCR 法 (RT-PCR) を利用することが出来る。IP-10 cDNA及びその関連DNA は、クローニングされ、配列決定されたIP-10 cDNA配列から推定されるアミノ酸配列に基づき特徴的な配列領域を選び、DNA プライマーをデザインして化学合成し、得られたDNA プライマー(プライマーセットを含む) を用いて、PCR 法、競合PCR 法、RT-PCR、Real-Time PCR (Journal of Molecular Endocrinology, 25, 169-193(2000)、その他の方法を用いてIP-10 関連遺伝子の単離、検出などに利用することが出来る。プライマーのサイズ (塩基数) は、鋳型DNAとの間の特異的なアニーリングを満足させることを考慮し、15-40塩基、望ましくは15-30塩基である。ただし、LA(long accurate) PCRを行う場合には、少なくとも30塩基が効果的である。センス鎖 (5' 末端側) とアンチセンス鎖 (3' 末端側) からなる1組あるいは1対 (2本) のプライマーが互いにアニールしないよう、両プライマー間の相補的配列を避けると共に、プライマー内のヘアピン構造の形成を防止するため自己相補配列をも避けるようにする。さらに、鋳型DNAとの安定な結合を確保するためGC含量を約50%にし、プライマー内においてGC-richあるいはAT-richが偏在しないようにする。アニーリング温度はT<sub>m</sub> (melting temperature) に依存するので、特異性の高いPCR産物を得るため、T<sub>m</sub>値が55-65°Cで互いに近似したプライマーを選定する。また、PCRにおけるプライマー使用の最終濃度が約0.1~約1 μMになるよう調整する等を留意することも必要である。また、プライマー設計用の市販のソフトウェア、例えばOligo<sup>TM</sup> (National Bioscience Inc., USA 製)、GENETYX(ソフトウ

ェア開発(株)(日本)製)等を用いることもできる。プライマーには、ユニバーサルプライマーとして知られたもの、例えばdTプライマーなどの公知のプライマーを使用することもできる。例えば、IP-10 mRNAのヒト組織中での発現を各種の組織由来poly (A)<sup>+</sup> RNA に対するノーザンブロット分析により検討することができる。本発明にしたがって、cDNAをプローブとして用いれば、例えばノーザン・ブロット、サザン・ブロット、in situ ハイブリダイゼーション、ドット・ブロット、RNase プロテクション・アッセイなどによりヒト組織中でのIP-10 mRNAの発現やIP-10 遺伝子自体などを検出・測定でき、ヒト組織における細胞内タンパク質代謝、ホルモン前駆体の活性化、さらには上記妊娠に関連した活性を含む、多くの正常な細胞のプロセスに関与する、胚仔と母体との間の相互作用における役割、不妊症、流産の様な多くの疾患等を含めた生理作用の研究の発展に貢献できる。IP-10 に関連した疾患の遺伝子診断にも利用できる。そうした診断は、当該IP-10 及び関連タンパク質をコードする核酸の異常、例えば損傷、突然変異、発現低下、発現過多などを診断するものであることができる。

該in situ ハイブリダイゼーションには、例えばノン RI in situ ハイブリダイゼーションが含まれてよく、そこには、例えば直接法及び間接法が含まれてよい。該直接法は、例えば核酸プローブに検出可能な分子(レーポーター)が直接結合しているものを使用し、該間接法は、例えばレーポーター分子に対する抗体などを使用してシグナルを増幅せしめているものである。核酸プローブ中のオリゴヌクレオタイドには、官能基(例えば、第一級脂肪族アミノ基、SH基など)が導入されており、こうした官能基にハプテン、蛍光色素、酵素などが結合せしめられていてもよい。核酸プローブの標識としては、代表的にはジギキシゲニン(DIG)、ビオチン、フルオレッセインなどが挙げられるが、下記抗体のところで説明する標識から適宜選択して使用することができるし、また多重ラベリングも利用でき、さらに標識抗体も利用できる。核酸プローブの標識法としては、当該分野で知られた方法から適宜選択して使用できるが、例えばランダムプライム法、ニック・トランスレーション法、PCR によるDNA の増幅、ラベリング/テイリング法、in vitro transcription法などが挙げられる。処理された試料の観察には、当該分野で知られた方法から適宜選択して使用できるが、例えば暗視野顕微鏡

、位相差顕微鏡、反射コントラスト顕微鏡、蛍光顕微鏡、デジタルイメージング顕微鏡、電子顕微鏡なども使用できるし、さらにフローサイトメトリーなどによることもできる。

本発明に従えば、本発明のIP-10 に関連して着床期の生理現象の遺伝子診断法（検出方法）が提供できる。該遺伝子診断法では、(a) 核酸試料を得る工程、(b) 工程(a) にて得られた核酸試料を、例えばPCR 法、RNA ポリメラーゼを利用した核酸増幅法、鎖置換増幅法などで遺伝子増幅し、例えば該IP-10 遺伝子に存在しうる変異部位などを含む領域が増幅された核酸断片を得る工程、及び(c) 工程(b) の核酸断片について変異の存在を調べる工程を含む態様が挙げられる。核酸増幅法としては、PCR法(RT-PCR法を含む)、NASBN (Nucleic acid sequence based amplification)法、TMA (Transcription-mediated amplification)法、SDA (Strand Displacement Amplification)法などの通常行われる遺伝子増幅法が含まれる。増幅の対象となるのは、目的に応じて適宜選択でき、例えば、増幅の対象となる変異部位を含む領域としては、本発明のIP-10 の遺伝子の塩基配列のうち、機能活性低下の原因となる変異を含んでいる領域であれば特に限定されず、例えば、配列表の配列番号：1 に示される塩基配列の中の任意の位置の塩基を含む領域が挙げられる。上記工程(c) においては、当該分野で当業者に知られている変異の存在に検出方法の中から適切な方法を選んでそれを適用でき、特に限定されないが、例えばASPCR (allele-specific PCR) 法により得られたDNA 断片長を調べることにより検出することができる。DNA 断片長を調べる方法は、特に限定されるものではないが、例えば蛍光DNA シークエンサーなどを使用して行うことができる。本工程で使用される変異検出法としては、例えば制限酵素断片長多型 (restriction fragment length polymorphism: RFLP) を検出して調べる方法などが挙げられる。また、変異の検出には、例えば変異部位を含む適当なDNA 片をプローブに用いるハイブリダイゼーション法や、SSCP法（単鎖高次構造多型）のような公知の変異検出法を使用してよい。本発明の遺伝子診断に従い、本発明のIP-10 に関係した遺伝子診断が可能であり、例えば不妊症、着床障害など、胚仔と母体との間の相互作用に関連した抵抗性・感受性決定の一素因と考えら

れる本発明のIP-10 の発現や多型を遺伝子診断し、さらに、当該診断結果に基づき関連した障害や問題のリスクを下げるような遺伝子治療を行うことが可能となる。

本明細書中で対象とするIP-10 及びそれに関連したタンパク質、そのフラグメント、さらにはDNA を含めた核酸(mRNA やオリゴヌクレオチドを含む) は、それらを単独あるいは有機的に使用し、更には当該分野で広く知られた遺伝子操作技術・抗体操作技術(例えば、アンチセンス法、モノクローナル抗体を含めた抗体、トランスジェニック動物など)とも適宜組合わせて、ゲノミックス及びプロテオミックス技術に応用できる。例えば、IP-10 変異体は、ドミナントネガティブ効果を利用した機能解析にも利用可能である。また、二本鎖RNA(dsRNA)を使用したRNAi(RNA interference)技術への応用の途もある。かくして、一塩基多型(SNP; single nucleotide polymorphisms)を中心とした遺伝子多型解析、核酸アレイ(DNAマイクロアレイを含む; Mark Shena (Ed.), "Microarray Biochip Technology", Eaton Publishing, March 2000)、タンパク質アレイを使用した遺伝子発現解析、遺伝子機能解析、関連遺伝子解析、タンパク質間相互作用解析、関連疾患解析、疾患治療薬解析をすることが可能となる。

RNAi技術を利用する場合、例えばsiRNA(short interfering RNA)をデザインしてそれを導入して行うことをしてもよい。siRNA をデザインする場合、代表的な場合、対象遺伝子のスタートコドンから約50~100塩基下流、例えば75塩基以上下流の領域に存在するAAで開始する19塩基の領域を選択する。好ましくは5'-や3'-UTRやスタートコドン近傍はそれを避けるが、場合によってはUTR 領域を対象とすることもできよう。該選択領域のGC含量が約30~70% 程度、例えば約45~55% 程度の領域を選択することが好ましい。2塩基(AA)+19塩基=21塩基の配列、例えばAA(N19)(N は任意のヌクレオチド)をDNA データベース、例えばNCBIなどで検索(例えば、BLAST サーチなど)してその特異性を確認する。選択した配列をもつ合成RNA にはその3' 端にdTdT(あるいはUU)が付加されていてよい。センス配列の合成RNA とそれに対応するアンチセンス配列の合成RNA を用意し、該合成RNA は、dsRNA とされて、細胞などに導入される。dsRNA 作製で使用する

典型的なアニーリングバッファとしては、例えば 100 mM KOAcと2 mM MgOAcを含有する30 mM HEPES-KOH, pH 7.4 液、50 mM NaClと1 mM EDTA を含有する10 mM Tris, pH 7.5~8.0 液などが挙げられるが、これに限定されるものではない。アニーリングの代表的な条件は、95℃ 2~3 分間とした後45~60分間かけて37~25℃にまで徐々に冷却するという処理条件が挙げられるが、これに限定されるものではない。形成されたdsRNA は、例えばフェノール/クロロホルム抽出-エタノール沈殿で回収できる。siRNA を哺乳動物などの細胞に導入する方法としては当該分野で知られた方法あるいはそれと実質的に同様な方法で行うことができ、例えばリン酸カルシウム法（例えば、F. L. Graham et al., *Virology*, 52: 456, 1973など）、DEAE-デキストラン法（例えば、D. Warden et al., *J. Gen. Virol.*, 3: 371, 1968など）、カチオン性脂質複合体形成法などのリボソーム法、エレクトロポレーション法（例えば、E. Neumann et al., *EMBO J*, 1: 841, 1982 など）、マイクロインジェクション法、biolistic 粒子導入法などが挙げられる。核酸導入法は、トランスフェクションにより効率的に行い得るような技術的改良が図られており、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、例えば Invitrogen社、QIAGEN社などのキット製造業者あるいはキット販売業者により明らかにされているプロトコルに従って実施することもできる。siRNA 技術については、例えば、Elbashir et al., *Nature*, 411: 494-498 (2001); Elbashir et al., *Genes Dev.*, 15: 188-200 (2001); 多比良和誠編、「実験医学別冊プロトコールシリーズ・遺伝子の機能阻害実験法」、羊土社、2001年などを参照することができる。

また、核酸アレイ技術では、DNAマイクロアレイなどが利用される。マイクロアレイの作製方法としては、固相担体表面で直接オリゴヌクレオチドを合成する方法（オン・チップ法）と、予め調製したオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを固相担体表面に固定する方法とが知られている。この発明で使用するマイクロアレイは、このいずれの方法でも作製することができる。オン・チップ法としては、光照射で選択的に除去される保護基の使用と、半導体製造に利用されるフォトリソグラフィ技術および固相合成技術とを組み合わせ、微少なマトリックスの所定の領域での選択的合成を行う方法（マスキング技術：例えば、Po

dor, S. P. A. Science 251:767, 1991)等によって行うことができる。一方、予め調製したオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを固相担体表面に固定する場合には、官能基を導入したオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを合成し、表面処理した固相担体表面にオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを点着し、共有結合させる（例えば、Lamture, J. B. et al. Nucl. Acids Res. 22:2121-2125, 1994; Guo, Z. et al. Nucl. Acids Res. 22:5456-5465, 1994）。オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、一般的には、表面処理した固相担体にスパーサーやクロスリンカーを介して共有結合させる。ガラス表面にポリアクリルアミドゲルの微小片を整列させ、そこに合成オリゴヌクレオチドを共有結合させる方法も知られている（Yershov, G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4913, 1996）。また、シリカマイクロアレイ上に微小電極のアレイを作製し、電極上にはストレプトアビジンを含むアガロースの浸透層を設けて反応部位とし、この部位をプラスに荷電させることでビオチン化オリゴヌクレオチドを固定し、部位の荷電を制御することで、高速で厳密なハイブリダイゼーションを可能にする方法も知られている（Sosnowski, R. G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1119-1123, 1997）。このように核酸アレイ技術では、cDNAライブラリーを使用したり、PCR 技術で得たDNA を基板上にスポッティング装置で高密度に配置して、ハイブリダイゼーションを利用して試料の解析が行われる。該アレイ化は、針あるいはピンを使用して、あるいはインクジェットプリンティング技術などをもって、スライドガラス、シリコン板、プラスチックプレートなどの基板のそれぞれ固有の位置にDNA が付着せしめられることによりそれを実施することができる。該核酸アレイ上でのハイブリダイゼーションの結果得られるシグナルを観察してデータを取得する。該シグナルは、蛍光色素などの標識（例えば、Cy3, Cy5, BODIPY, FITC, Alexa Fluor dyes (商品名), Texas red (商品名) など) より得られるものであってよい。検知にはレーザースキャナーなどを利用することもでき、得られたデータは適当なアルゴリズムに従ったプログラムを備えたコンピューターシステムで処理されてよい。典型的なマイクロアレイを使用するの遺伝子などの解析では、例えば細胞などの試料から単離したmRNAを鋳型として、cDNAを合成し、PCR増幅する。その際に、標識dNTPを取り込ませて標識cDNAとする。



この標識cDNAをマクロアレイに接触させ、マイクロアレイのキャプチャプローブ（オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド）にハイブリダイズしたcDNAを検出する。ハイブリダイゼーションは、96穴もしくは384穴プラスチックプレートに分注して標識cDNA水性液を、マイクロアレイ上に点着することによって実施することができる。点着の量は、1～100nl程度とすることができる。ハイブリダイゼーションは、室温～70℃の温度範囲で、6～20時間の範囲で実施することが好ましい。ハイブリダイゼーション終了後、界面活性剤と緩衝液との混合溶液を用いて洗浄を行い、未反応の標識cDNAを除去する。界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を用いることが好ましい。緩衝液としては、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等を用いることができるが、クエン酸緩衝液を用いることが好ましい。

また、タンパク質アレイ技術では、タグを付された組換え発現タンパク質産物を利用してよく、二次元電気泳動(2-DE)、酵素消化フラグメントを含めての質量分析 (MS)(これにはエレクトロスプレーイオン化法(electrospray ionization: ESI), マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(matrix-assisted laser desorption/ionization: MALDI)などの技術が含まれ、MALDI-TOF 分析計、ESI-3 連四重極分析計、ESI-イオントラップ分析計などを使用してよい)、染色技術、同位体標識及び解析、画像処理技術などが利用されることができる。したがって、本発明には上記で得られるあるいは利用できるIP-10 及びそれに対する抗体などと相関した胚仔と母体との間の相互作用に関連した機能解析に関連したソフトウェア、データベースなども含まれてよい。

本発明に従えば、IP-10 遺伝子の発現を阻害することのできるアンチセンス・オリゴヌクレオチド（核酸）を、クローン化したあるいは決定されたIP-10 をコードするDNA の塩基配列情報に基づき設計し、合成して、解明されたIP-10 機能を探査したり、調節するのに使用しうる。そうしたオリゴヌクレオチド（核酸）は、IP-10 遺伝子のmRNAとハイブリダイズすることができ、該mRNAの機能を阻害することができるか、あるいはIP-10 関連mRNAとの相互作用などを介してIP-10 遺伝子の発現を調節・制御することができる。またある場合には、IP-10 発現制

御領域をコントロールして、IP-10 遺伝子の発現を調節・制御することができる。IP-10 関連遺伝子の選択された配列に相補的なオリゴヌクレオチド、及びIP-10 関連遺伝子と特異的にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドは、生体内及び生体外でIP-10 遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、またそれに関連した病気などの治療又は診断に有用である。

以上述べた、本発明者らの研究成果によりIP-10 の遺伝子及び組換えDNA 分子を宿主に移入し、IP-10 を発現させ、目的とするIP-10 を得て、それらを利用して胚仔と母体との間の相互作用に関連した機能を研究・探査する方法が提供される。こうして本発明によれば、該解明された機能に関連しての、IP-10 の遺伝子を実質的に発現する組換え体あるいはトランスフェクタント及びその製造法、さらにはその用途も提供される。

また、本発明では、胚仔と母体との間の相互作用に関連した現象や機能を研究・探査するため、IP-10 遺伝子、それから誘導されたプローブを用い、あるいはさらに必要に応じ、IP-10 に対する阻害物質を用い、被検試料中のIP-10 あるいはその遺伝子、さらには産生細胞を検知・分別定量する優れた方法及びその為の試薬キットを提供することにある。本発明はこうしたIP-10 あるいはその遺伝子、さらには産生細胞を検知・分別定量することのできる試薬キットのうちの各試薬をすべてその実施態様のうちに含むと理解される。さらに本発明の目的は、上記方法を用いてIP-10 あるいはその遺伝子、さらには産生細胞を検知・分別定量することにより、細胞内タンパク質代謝、ホルモン前駆体の活性化、胚遊走活性化作用、胚の子宮壁への着床促進作用、不妊治療活性、妊娠効率促進作用、着床期に胚を子宮に誘因する活性、胚仔と母体との間の相互作用調整活性など、さらにはそれらのプロセスに関与する因子や生理現象などをモニターし得る方法並びに試薬あるいは診断剤を提供することができる。

したがって、医学的・生理学的分野における上記試薬の各種利用、胚仔とIP-10 との相互作用、胚遊走活性化作用、胚の子宮壁への着床促進作用、不妊治療活性、妊娠効率促進作用、着床期に胚を子宮に誘因する活性、胚仔と母体との間の

相互作用調整活性などに起因する応答・症状・疾患の研究・解析・測定、診断、予防、治療などの目的で上記試薬を使用することは、すべて本発明のその実施態様のうちに含まれると理解される。

本発明で対象とするIP-10 及びその関連物質は、着床期における胚と母体との間において重要な働きを有する因子であると考えられる。胚のシグナルに対して母体がIP-10 を適切な時期に適量を分泌させ、それによって母体側の生理的、免疫的な応答経路が確立し、その結果として妊娠（着床）が進行し、このシグナルに対する応答が不十分な場合には妊娠は成立しない。したがって、該タンパク質は胚と母体との間のコミュニケーションに有用であると考えられる。すなわち、IP-10 、変異体、修飾体、誘導体を含む医薬を用いれば、IP-10 による活性が不十分であることに起因する不妊症患者を健康な状態にすることが可能である。本発明のポリペプチドは、こうした問題の治療及び／又は予防剤などの医薬として有用である。

例えば、生体内においてIP-10 が減少あるいは欠損しているために、細胞における当該生物学的活性が十分に得られていないか、あるいは正常でない症状の患者の場合には、(A) 本発明のタンパク質等を該患者に投与することによるか、(B) 本発明のDNA などの核酸を該患者に投与して、生体内で本発明のタンパク質等を発現させることによるか、(C) 本発明のDNA などの核酸を発現可能に導入した細胞を該患者に移植することによって、生体内に本発明のタンパク質等を補充する等して、該患者における当該症状を改善したりする。つまり、IP-10 産生を誘起させることによって、またはIP-10 を投与することによって妊娠率の向上をはかる。

本発明のIP-10 の生物学的活性などの機能の解明に基づいて、該IP-10 の機能を促進する化合物（アゴニスト、あるいは促進剤）又はその塩は、IP-10 機能不全による妊娠障害などの上記で指摘した生物活性に関連した症状などの各種の疾病の治療及び／又は予防剤として有用な医薬（獣医薬を含む）として使用できる。一方、本発明のIP-10 の生物学的活性などの機能を阻害する化合物（アンタゴニスト、あるいは阻害剤）又はその塩は、過IP-10 機能症、妊娠制御などにおい

て治療及び／又は予防剤などの医薬として使用できる。

かくして、本発明で明らかにされたIP-10 の機能に着目して、IP-10 などのポリペプチド等は、その胚仔と母体との間の相互作用などに関連した生理現象を促進する化合物（アゴニスト）や阻害する化合物（アンタゴニスト）又はそれらの塩をスクリーニングするための試薬として有用である。本発明は、こうした生理作用あるいは生物活性をを促進する化合物（アゴニスト）や阻害する化合物（アンタゴニスト）又はそれらの塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニングでは、例えば(i) 本発明のタンパク質、その一部のペプチド又はそれらの塩（該タンパク質を発現する形質転換体を含んでいてもよい、以下同様）などに胚を接触させた場合と、(ii)本発明のタンパク質、その一部のペプチド又はそれらの塩などに胚及び試験試料を接触させた場合との比較を行う。具体的には、上記スクリーニングでは、当該生物学的活性（例えば、胚と子宮膜との相互作用に関連した活性など）を測定して、比較する。スクリーニングでは、胚に代えて、適切な基質を使用することもでき、該基質は、そのまま使用してもよいが、好ましくはフルオレッセインなどの蛍光、酵素や放射性物質で標識したものを使用できる。

試験試料としては、例えばタンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、植物抽出物、動物などの組織抽出物、細胞抽出物などが挙げられる。試験試料に使用される試験化合物の例には、好ましくは抗IP-10 抗体、抗CXCR3 抗体、抗IFN- $\tau$ 抗体、CXCR3 とIP-10 の結合阻害剤、胚の着床に対するインヒビター活性を有する化合物、胚の着床に対する促進活性を有する化合物、特に合成化合物などを含んでいてよい。これら化合物は、新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。該スクリーニングは、通常の結合活性の測定法に準じて実施することができ、例えば当該分野で公知の方法などを参考にして行うことができる。また、各種標識、緩衝液系その他適当な試薬等を使用したり、そこで説明した操作等に準じて行うことができる。使用ペプチドなどは、活性化剤で処理したり、その前駆体あるいは潜在型のものを活性型のものに予め変換しておくこともできる。測定は通常トリス塩酸緩衝液、リン酸塩緩衝

液などの反応に悪影響を与えないような緩衝液等の中で、例えば、pH約4～約10（好ましくは、pH約6～約8）において行うことができる。これら個々のスクリーニングにあたっては、それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて、本発明のIP-10 あるいはそれと実質的に同等な活性を有するポリペプチドあるいはペプチドに関連した測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、Methods in Enzymology, Academic Press 社 (USA)発行〕など参照〕。

本発明のスクリーニング方法又はスクリーニングキットを用いて得られる化合物又はその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などから選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質等の機能を促進あるいは阻害する化合物である。該化合物の塩としては、例えば、薬学的に許容される塩などが挙げられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。無機塩基との塩の好適な例としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、並びにアルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。有機塩基との塩の好適な例としては、例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2,6-ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸などとの塩が挙げられる。有機酸との塩の好適な例としては、例えば、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸などとの塩が挙げられる。塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えば、アルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられ、酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸

などとの塩が挙げられる。

本明細書中、「抗体」との用語は、広義の意味で使用されるものであってよく、所望のIP-10 ポリペプチド及び関連ペプチド断片に対するモノクローナル抗体の単一のものや各種エピトープに対する特異性を持つ抗体組成物であってよく、また1価抗体または多価抗体並びにポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を含むものであり、さらに天然型(intact)分子並びにそれらのフラグメント及び誘導体も表すものであり、F(ab')<sub>2</sub>、Fab' 及びFab といったフラグメントを包含し、さらに少なくとも二つの抗原又はエピトープ (epitope)結合部位を有するキメラ抗体若しくは雑種抗体、又は、例えば、クワドローム(quadrome)、トリオーム(triome)などの二重特異性組換え抗体、種間雑種抗体、抗イディオタイプ抗体、さらには化学的に修飾あるいは加工などされてこれらの誘導体と考えられるもの、公知の細胞融合又はハイブリドーマ技術や抗体工学を適用したり、合成あるいは半合成技術を使用して得られた抗体、抗体生成の観点から公知である従来技術を適用したり、DNA 組換え技術を用いて調製される抗体、本明細書で記載する標的抗原物質あるいは標的エピトープに関して中和特性を有したりする抗体又は結合特性を有する抗体を包含してよい。特に好ましい本発明の抗体は、天然型のIP-10 ポリペプチドを特異的に識別できるものである。

抗原物質に対して作製されるモノクローナル抗体は、培養中の一連のセルラインにより抗体分子の産生を提供することのできる任意の方法を用いて産生される。修飾語「モノクローナル」とは、実質上均質な抗体の集団から得られているというその抗体の性格を示すものであって、何らかの特定の方法によりその抗体が産生される必要があるとみなしてはならない。個々のモノクローナル抗体は、自然に生ずるかもしれない変異体が僅かな量だけ存在しているかもしれないという以外は、同一であるような抗体の集団を含んでいるものである。モノクローナル抗体は、高い特異性を持ち、それは単一の抗原性をもつサイトに対して向けられているものである。異なった抗原決定基(エピトープ)に対して向けられた種々の抗体を典型的には含んでいる通常の(ポリクローナル)抗体調製物と対比すると、それぞれのモノクローナル抗体は当該抗原上の単一の抗原決定基に対して向

けられているものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養により合成され、他のイムノグロブリン類の夾雑がないあるいは少ない点でも優れている。モノクローナル抗体は、ハイブリッド抗体及びリコンビナント抗体を含むものである。それらは、所望の生物活性を示す限り、その由来やイムノグロブリンクラスやサブクラスの種別に関わりなく、可変領域ドメインを定常領域ドメインで置き換えたり（例えば、ヒト化抗体）、あるいは軽鎖を重鎖で置き換えたり、ある種の鎖を別の種の鎖でもって置き換えたり、あるいはヘテロジニアスなタンパク質と融合せしめたりして得ることができる（例えば、米国特許第4816567号; Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.79-97, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987 など）。

モノクローナル抗体を製造する好適な方法の例には、ハイブリドーマ法 (G. Kohler and C. Milstein, Nature, 256, pp.495-497 (1975)); ヒトB細胞ハイブリドーマ法 (Kozbor et al., Immunology Today, 4, pp.72-79 (1983); Kozbor, J. Immunol., 133, pp.3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63, Marcel Dekker, Inc., New York (1987); トリオーマ法; EBV-ハイブリドーマ法 (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96 (1985))(ヒトモノクローナル抗体を産生するための方法); 米国特許第4946778号 (単鎖抗体の産生のための技術) が挙げられる他、抗体に関して以下の文献が挙げられる: S. Biocca et al., EMBO J, 9, pp.101-108 (1990); R.E. Bird et al., Science, 242, pp.423-426 (1988); M.A. Boss et al., Nucl. Acids Res., 12, pp.3791-3806 (1984); J. Bukovsky et al., Hybridoma, 6, pp.219-228 (1987); M. DAINO et al., Anal. Biochem., 166, pp.223-229 (1987); J.S. Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, pp.5879-5883 (1988); P.T. Jones et al., Nature, 321, pp.522-525 (1986); J.J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 121 (Immunochemical Techniques, Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies), Academic Press, New York (1986); S. Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, pp.6851-6855 (1984); V.

T. Oi et al., *BioTechniques*, 4, pp.214-221 (1986); L. Riechmann et al., *Nature*, 332, pp.323-327 (1988); A. Tramontano et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, pp.6736-6740 (1986); C. Wood et al., *Nature*, 314, pp.446-449 (1985); *Nature*, 314, pp.452-454 (1985) あるいはそこで引用された文献（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）。

本発明に係るモノクローナル抗体は、それらが所望の生物活性を示す限り、重鎖及び／又は軽鎖の一部が特定の種から誘導される又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応配列と同一又はホモログスであるが、一方、鎖の残部は、別の種から誘導される又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応配列と同一又はホモログスである、「キメラ」抗体（免疫グロブリン）を特に包含する（米国特許第4816567号明細書；Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, pp.6851-6855 (1984)）。

抗体は、それをトリプシン、パパイン、ペプシンなどの酵素により処理して、場合により還元して得られるFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>といった抗体フラグメントであってもよい。

抗体は、既知の任意の検定法、例えば競合的結合検定、直接及び間接サンドイッチ検定、及び免疫沈降検定に使用することができる（Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987)）。

抗体を検出可能な原子団にそれぞれコンジュゲートするには、当分野で知られる任意の方法を使用することができ、例えば、David et al., *Biochemistry*, 13巻, 1014-1021 頁 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Meth.*, 40: pp.219-231 (1981);及び“*Methods in Enzymology*”, Vol. 184, pp.138-163 (1990) により記載の方法が挙げられる。標識物を付与する抗体としては、IgG 画分、更にはペプシン消化後還元して得られる特異的結合部Fab'を用いることができる。これらの場合の標識物の例としては、下記するように酵素（ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼあるいはβ-D-ガラクトシダーゼなど）、化学物質、蛍光物質あるいは放射性同位元素などがある。



本発明で 検知・測定は、イムノ染色、例えば組織あるいは細胞染色、免疫電子顕微鏡解析、イムノアッセイ、例えば競合型イムノアッセイまたは非競合型イムノアッセイで行うことができ、ラジオイムノアッセイ(RIA)、蛍光イムノアッセイ(FIA)、ルミネッセントイムノアッセイ(LIA)、エンザイムイムノアッセイ(BIA)、ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) などを用いることができ、B-F分離を行ってもよいし、あるいは行わないでその測定を行うことができる。好ましくはRIA, BIA, FIA, LIAであり、さらにサンドイッチ型アッセイが挙げられる。サンドイッチ型アッセイには、同時サンドイッチ型アッセイ、フォワード (forward) サンドイッチ型アッセイあるいは逆サンドイッチ型アッセイなどが包含されてよい。

標識としては、酵素、酵素基質、酵素インヒビター、補欠分子類、補酵素、酵素前駆体、アポ酵素、蛍光物質、色素物質、化学ルミネッセンス化合物、発光物質、発色物質、磁気物質、金属粒子、例えば金コロイドなど、放射性物質などを挙げるができる。酵素としては、脱水素酵素、還元酵素、酸化酵素などの酸化還元酵素、例えばアミノ基、カルボキシル基、メチル基、アシル基、リン酸基などを転移するのを触媒する転移酵素、例えばエステル結合、グリコシド結合、エーテル結合、ペプチド結合などを加水分解する加水分解酵素、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼなどを挙げるができる。酵素は複数の酵素を複合的に用いて検知に利用することもできる。例えば酵素的サイクリングを利用することもできる。

酵素標識は、ビオチン標識体と酵素標識アビジン（ストレプトアビジン）に置き換えることも可能である。標識は、複数の異なった種類の標識を使用することもできる。こうした場合、複数の測定を連続的に、あるいは非連続的に、そして同時にあるいは別々に行うことを可能にすることもできる。

標識するには、チオール基とマレイミド基の反応、ピリジルジスルフィド基とチオール基の反応、アミノ基とアルデヒド基の反応などを利用して行うことができ、公知の方法あるいは当該分野の当業者が容易になしうる方法、さらにはそれらを修飾した方法の中から適宜選択して適用できる。

例えば、本発明でIP-10 などの測定系としては、例えば組織に対しては免疫染

色、免疫電子顕微鏡などの蛋白測定系、in situ hybridization などの発現遺伝子測定系が、組織抽出物に対してはEIA, RIA, FIA, LIA, ウェスタンブロッティングなどの蛋白測定系、ノーザンブロッティング、サザンブロッティング、ドットプロット、RNase プロテクションアッセイ、RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)、Real-Time PCR、競合PCR などの発現遺伝子測定系が、そして血中、体液などに対してはEIA, RIA, FIA, LIA, ウェスタンブロッティングといった蛋白測定系が有利に利用できる。EIA の測定系において、例えば競合法では、抗IP-10抗体を固相化抗体として使用し、標識抗原及び非標識抗原（抗原としては、IP-10あるいはそのフラグメントペプチドなどが挙げられる）を使用するし、また非競合法で、例えばサンドイッチ法では、固相化抗IP-10抗体や標識抗IP-10抗体を利用できる他、抗IP-10抗体を直接標識したり、固相化せずに、抗IP-10抗体に対する抗体を標識したり、固相化して行うこともできる。感度増幅法としては、例えば、非酵素標識一次抗体との組み合わせでは、高分子ポリマーと酵素と一次抗体を利用するもの（Envision試薬を応用したもの；Enhanced polymer one-step staining (EPOS))が挙げられ、非酵素標識二次抗体との組合せでは、例えば PAP (peroxidase-antiperoxidase)法などの酵素と抗酵素抗体複合体の組合せ、ABC (avidin-biotin complex) 法などのビオチン標識二次抗体とビオチン標識酵素-アビジン複合体の組合せ、SABC (streptavidin-biotinylated peroxidase complex) 法、LSAB (labeled streptavidin-biotin)法などのビオチン標識二次抗体とビオチン標識酵素-ストレプトアビジン複合体の組合せ、CSA (catalyzed signal amplification)法などのSABCとビオチン標識タイラミドと酵素標識ストレプトアビジンの組合せ、高分子ポリマーで二次抗体と酵素を標識してあるものなどが挙げられる。

これら個々の免疫学的測定法を含めた各種の分析・定量法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常技術的配慮を加えて、本発明の当該対象物質あるいはそれと実質的に同等な活性を有する物質に関連した測定系を構築すればよい。

これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編、「ラジオイムノアッセイ」、講談社、昭和49年発行；入江 寛編、「続ラジオイムノアッセイ」、講談社、昭和54年発行；石川 栄治ら編、「酵素免疫測定法」、医学書院、昭和53年発行；石川 栄治ら編、「酵素免疫測定法」（第2版）、医学書院、昭和57年発行；石川 栄治ら編、「酵素免疫測定法」（第3版）、医学書院、昭和62年発行；H. V. Vunakis et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 70 (Immunochemical Techniques, Part A), Academic Press, New York (1980); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 73 (Immunochemical Techniques, Part B), Academic Press, New York (1981); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 74 (Immunochemical Techniques, Part C), Academic Press, New York (1981); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 84 (Immunochemical Techniques, Part D: Selected Immunoassays), Academic Press, New York (1982); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 92 (Immunochemical Techniques, Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods), Academic Press, New York (1983); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 121 (Immunochemical Techniques, Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies), Academic Press, New York (1986); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 178 (Antibodies, Antigens, and Molecular Mimicry), Academic Press, New York (1989); M. Wilchek et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 184 (Avidin-Biotin Technology), Academic Press, New York (1990); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 203 (Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications, Part B: Antibodies and Antigens, Nucleic Acids, Polysaccharides, and Drugs), Academic Press, New York (1991) などあるいはそこで引用された文献（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）〕。

本発明の活性成分〔例えば、(a) IP-10 ポリペプチド、その一部のペプチドまたはそれらの塩、それに関連するペプチド等、(b) 該IP-10 あるいはIP-10 ポリペプチドをコードするDNA などの核酸等、(c) 本発明で対象とする抗体、その一部断片（モノクローナル抗体を包含する）またはその誘導体、(d) IP-10 による胚と母体との間の着床などの相互作用を促進及び／又は活性化するなどの現象あるいはそれに関連した組織あるいはタンパク質の変質・過剰生産あるいは分解現象といった生物学的活性を促進及び／又は活性化する化合物またはその塩、IP-10 産生を制御する化合物またはその塩、あるいはIP-10 による胚と母体との間の着床などの相互作用を抑制及び／又は阻害するなどの現象あるいはそれに関連した組織あるいはタンパク質の変質・過剰生産あるいは分解現象といった生物学的活性を抑制及び／又は阻害する化合物またはその塩、(e) 本発明で対象とするDNA などの核酸に対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドなど、(f) 本発明を使用して見出された活性物質など〕を医薬として用いる場合、例えば胚と母体との間の相互作用促進剤またはそれらの塩等は、通常単独或いは薬理的に許容される各種製剤補助剤と混合して、医薬組成物又は医薬調製物などとして投与することができる。好ましくは、経口投与、局所投与、または非経口投与等の使用に適した製剤調製物の形態で投与され、目的に応じていずれの投与形態（吸入法、あるいは直腸投与も包含される）によってもよい。

また、本発明の活性成分は、ホルモン作用剤、ビタミン剤、サイトカイン類、インターフェロン類、その他の生理活性物質及び／又は免疫調整剤と配合して使用することもでき、それらは、有利な働きを持つものであれば制限なく使用でき、例えば当該分野で知られたものの中から選択することができる。

そして、非経口的な投与形態としては、局所、経皮、静脈内、筋肉内、皮下、皮内もしくは腹腔内投与を包含し得るが、患部への直接投与も可能であり、またある場合には好適でもある。好ましくはヒトを含む哺乳動物に経口的に、あるいは非経口的（例、細胞内、組織内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内、胸腔内、脊髓腔内、点滴法、注腸、経直腸、点耳、点眼や点鼻、歯、皮膚や粘膜への塗布など）に投与することができる。具体的な製剤調製物の形態としては、溶液

製剤、分散製剤、半固形製剤、粉粒体制剤、成型製剤、浸出製剤などが挙げられ、例えば、錠剤、被覆錠剤、糖衣を施した剤、丸剤、トローチ剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、マイクロカプセル剤、埋込剤、粉末剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、注射剤、液剤、エリキシル剤、エマルジョン剤、灌注剤、シロップ剤、水剤、乳剤、懸濁剤、リニメント剤、ローション剤、エアゾール剤、スプレー剤、吸入剤、噴霧剤、軟膏製剤、硬膏製剤、貼付剤、パスタ剤、パップ剤、クリーム剤、油剤、坐剤（例えば、直腸坐剤）、チンキ剤、皮膚用水剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、塗布剤、輸液剤、注射用液剤などのための粉末剤、凍結乾燥製剤、ゲル調製品等が挙げられる。

医薬用の組成物は通常の方法に従って製剤化することができる。例えば、適宜必要に応じて、生理学的に認められる担体、医薬として許容される担体、アジュバント剤、賦形剤、補形剤、希釈剤、香味剤、香料、甘味剤、ベヒクル、防腐剤、安定化剤、結合剤、pH調節剤、緩衝剤、界面活性剤、基剤、溶剤、充填剤、増量剤、溶解補助剤、可溶化剤、等張化剤、乳化剤、懸濁化剤、分散剤、増粘剤、ゲル化剤、硬化剤、吸収剤、粘着剤、弾性剤、可塑剤、崩壊剤、噴射剤、保存剤、抗酸化剤、遮光剤、保湿剤、緩和剤、帯電防止剤、無痛化剤などを単独もしくはは組合わせて用い、それとともに本発明のタンパク質等を混和することによって、一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態にして製造することができる。

非経口的使用に適した製剤としては、活性成分と、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る媒体との無菌性溶液、または懸濁液剤など、例えば注射剤等が挙げられる。一般的には、水、食塩水、デキストロース水溶液、その他関連した糖の溶液、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどのグリコール類が好ましい注射剤用液体担体として挙げられる。注射剤を調製する際は、蒸留水、リンゲル液、生理食塩液のような担体、適当な分散化剤または湿化剤及び懸濁化剤などを使用して当該分野で知られた方法で、溶液、懸濁液、エマルジョンのごとき注射しうる形に調製する。

ポリエチレングリコール (PEG) は、哺乳動物中で極めて毒性が低いことから、

それを結合させることは特に有用である。また、PEG を結合せしめると、異種性化合物の免疫原性及び抗原性を効果的に減少せしめることができる場合がある。該化合物は、マイクロカプセル装置の中に入れて与えてもよい。PEG のようなポリマーは、アミノ末端のアミノ酸の $\alpha$ -アミノ基、リジン側鎖の $\epsilon$ -アミノ基、アスパラギン酸又はグルタミン酸側鎖のカルボキシル基、カルボキシ末端のアミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基、又はある種のアスパラギン、セリン又はトレオニン残基に付着したグリコシル鎖の活性化された誘導体に、簡便に付着させることができる。

タンパク質との直接的な反応に適した多くの活性化された形態のPEG が知られている。タンパク質のアミノ基と反応させるのに有用なPEG 試薬としては、カルボン酸、カルボネート誘導体の活性エステル、特に、脱離基がN-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェノール、イミダゾール、又は1-ヒドロキシ-2-ニトロベンゼン-4-スルフォネートであるものが挙げられる。同様に、アミノヒドラジン又はヒドラジド基を含有するPEG 試薬は、タンパク質中の過ヨウ素酸酸化によって生成したアルデヒドとの反応に有用である。

さらに、本発明のDNA などの核酸を上記したような治療及び／又は予防剤として用いる場合、該核酸はそれを単独で用いることもできるし、あるいは上記したような遺伝子組換え技術で使用する適当なベクター、例えばレトロウイルス由来ベクターなどウイルス由来のベクターなどに結合させるなどして用いることができる。本発明のDNA などの核酸は通常の方法で投与でき、そのまま、あるいは、例えば細胞内への摂取が促進されるように、適当な補助剤あるいは生理的に許容される担体などと共に、製剤化されて用いることができ、上記したような、医薬組成物又は医薬調製物などとして投与することができる。また遺伝子治療として知られた方法を適用することもできる。

本発明の活性成分は、その投与量を広範囲にわたって選択して投与できるが、その投与量及び投与回数などは、処置患者の性別、年齢、体重、一般的健康状態、食事、投与時間、投与方法、排泄速度、薬物の組み合わせ、患者のその時に治療を行なっている病状の程度に応じ、それらあるいはその他の要因を考慮して決

められる。

医薬品製造にあたっては、その添加剤等や調製法などは、例えば日本薬局方解説書編集委員会編、第十四改正 日本薬局方解説書、平成13年6月27日発行、株式会社廣川書店；一番ヶ瀬 尚 他編 医薬品の開発12巻（製剤素剤〔I〕）、平成2年10月15日発行、株式会社廣川書店；同、医薬品の開発12巻（製剤素材〔II〕）平成2年10月28日発行、株式会社廣川書店などの記載を参考にしてそれらのうちから必要に応じて適宜選択して適用することができる。

本発明の活性成分は、典型的には、胚と母体との相互作用を促進あるいは活性化するという生物学的活性をもつものであれば特に限定されないが、好ましくは有利な作用を持つものが挙げられる。本発明の活性成分は、例えば、(a) IP-10、その変異体ポリペプチド、その一部のペプチドまたはそれらの塩等、(b) 該 IP-10 をコードするDNA、IP-10 変異体ポリペプチドをコードするDNA などの核酸等、(c) 本発明の抗体、その一部断片（モノクローナル抗体を包含する）またはその誘導体、(d) IP-10 による、胚遊走活性化、胚の子宮壁への着床促進、不妊治療、妊娠効率促進、着床期に胚を子宮に誘因する活性、胚仔と母体との間の相互作用調整活性などの活性のうちの少なくとも一つあるいはそれ以上を有するという有利な作用をもつ化合物またはその塩などが包含される。

本発明の活性成分は、例えば胚遊走活性化、胚の子宮壁への着床促進、不妊治療、妊娠効率促進、着床期に胚を子宮に誘因する活性、胚仔と母体との間の相互作用調整活性などの生物活性を利用した薬物並びにそれを用いた予防あるいは治療法に有用と期待される。

本発明では、「遺伝子組換え技術」を利用して所定の核酸を単離・配列決定したり、組換え体を作製したり、所定のペプチドを得ることができる。本明細書中使用できる遺伝子組換え技術としては、当該分野で知られたものが挙げられ、例えば J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", (2nd edition, 1989 & 3rd edition, 2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series

s), IRL Press, Oxford University Press (1995); "Methods in Enzymology" シリーズ, Academic Press, New York、例えば R. Wu ed., ibid., Vol. 68 (Recombinant DNA), (1980); R. Wu et al. ed., ibid., Vol. 100 (Recombinant DNA, Part B) & 101 (Recombinant DNA, Part C), (1983); R. Wu et al. ed., ibid., Vol. 153 (Recombinant DNA, Part D), 154 (Recombinant DNA, Part E) & 155 (Recombinant DNA, Part F), (1987); J. H. Miller ed., ibid., Vol. 204, (1991); R. Wu ed., ibid., Vol. 216 (Recombinant DNA, Part G), (1992); R. Wu ed., ibid., Vol. 217 (Recombinant DNA, Part H) & 218 (Recombinant DNA, Part I), (1993); J. L. Campbell ed., ibid., Vol. 262 (DNA Replication), (1995); P. M. Conn ed., ibid., Vol. 302 (Green Fluorescent Protein), (1999); S. Weissman ed., ibid., Vol. 303 (cDNA Preparation and Characterization), (1999); J. C. Glorioso et al. ed., ibid., Vol. 306 (Expression of Recombinant Genes in Eukaryotic Systems), (1999); M. Ian Phillips ed., ibid., Vol. 313 (Antisense Technology, Part A: General Methods, Methods of Delivery and RNA Studies) & 314 (Antisense Technology, Part B: Applications), (1999); J. Thorner et al. ed., ibid., Vol. 326 (Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins, Part A: Gene Expression and Protein Purification), 327 (Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins, Part B: Cell Biology and Physiology) & 328 (Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins, Part C: Protein-Protein Interactions and Genomics), (2000)などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法が挙げられる（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）。本発明の診断方法等に使用可能な薬剤の調製は、例えばA. Gennaro ed., "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18th Edition, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990等に、分子生物学的技術は、例えばAusubel, F. M. et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995等に記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる（それらの中にある記載はそれを参照す



ることにより本明細書の開示に含められる)。

明細書及び図面において、用語は、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによるか、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものである。

### 実施例

以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、この実施例は単に本発明の説明のため、その具体的な態様の参考のために提供されているものである。これらの例示は本発明の特定の具体的な態様を説明するためのものであるが、本願で開示する発明の範囲を限定したり、あるいは制限することを表すものではない。本発明では、本明細書の思想に基づく様々な実施形態が可能であることは理解されるべきである。

全ての実施例は、他に詳細に記載するもの以外は、標準的な技術を用いて実施したもの、又は実施することのできるものであり、これは当業者にとり周知で慣用的なものである。

なお、以下の実施例において、特に指摘が無い場合には、具体的な操作並びに処理条件などは、DNA クローニングでは J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", (2nd edition, 1989 & 3rd edition, 2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 及び D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995) ; 特にPCR 法では、H. A. Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, 1989 ; D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995) 及び M. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols", Academic Press, New York (1990) に記載の方法に準じて行っているし、また市販の試薬あるいはキットを用いている場合はそれらに添付の指示書(protocols) や添付の薬品等を使用している。

### 実施例 1

#### [動物及び組織調製]

US Meat Animal Research Center, Clay Center, NE (米国)において維持されてきたホワイト・フェース雑種雌ヒツジを用い、羊についての実験プロトコルは USDA の「実験動物 (使用) 委員会」により承認されている手法に従った。

Imakawa K. et al., Endocr. J., 45: 441-450 (1998) に記載のようにして、動物の飼育及び発情の同期化を行った。発情周期の15日目 (n=9)のヒツジからの子宮、及び妊娠14日目 (n=3)、17日目 (n=9)、20日目 (n=3)、25日目 (n=3)、そして30日目 (n=3)のヒツジからの子宮を、屠殺後に直ちに取出した。発情周期の15日目のヒツジ及び妊娠17日目のヒツジからのそれぞれの三つの子宮につき、Imakawa K. et al., Endocr. J., 45: 441-450 (1998) に記載のようにして、全子宮を固定化处理に付し、そしてin situ ハイブリダイゼーション用にさらに発情周期の15日目のヒツジ及び妊娠17日目のヒツジからの三つの子宮全体を直ちに凍結した。妊娠した残りのヒツジ (調査の各日あたりn=3) から集められた子宮内膜組織及び胚仔 (コンセプタス又は受胎産物: 胚並びに胚膜を指す) 組織について凍結し、 $-70^{\circ}\text{C}$ で保存した。これら凍結された組織は RNA抽出処理に付された。東京大学農場で三頭の発情周期雌ヒツジから全血を集め、それから末梢血多核細胞(PBMC)を得た。これらの試料は、IFN 類量に対する応答性やケモタキシスアッセイに使用された。さらに3頭の発情周期の雌ヒツジから全子宮を摘出し、子宮内膜外植片をIP-10 産生に対するIFN の刺激効果を調べるために培養した。羊の使用法は、東京大学の「実験動物 (使用) 委員会」により承認されている。Aida H. et al., J Reprod Dev., 45:249-257(1999) に従って動物の飼育及び発情の同期化を行った。

#### [in vitro 培養]

Domenech A. et al., J Gen Virol., 81:109-118(2000)に記載の方法を幾分か改良した方法を使用して発情周期15日目のヒツジから初代単球並びにリンパ球細胞を単離した。EDTA処理した血液 (80 ml)より密度勾配遠心法 ( $800 \times g$ ,  $20^{\circ}\text{C}$ , 30分間, OptiPrep™, Nycomed, Roskilde、デンマーク) でもってPBMCを分

離し、10% FCS, 40 ユニット/ml のペニシリン, 40  $\mu$ /ml のストレプトマイシン及び抗胸膜肺炎様微生物(PPLO)剤 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA、米国) を添加したRPMI 1640 培地の中に懸濁した。3  $\times$  10<sup>7</sup>個/ml になるようにしてPBMCを6-ウェルのコースタープレート(3 ml/ウェル) に播種し、37°Cで5% CO<sub>2</sub>-95%空気雰囲気でもって2時間培養した。非接着性細胞(リンパ球細胞)から接着性細胞(単球細胞)を分離し、上記のように添加物を補ってある新鮮なRPMI 1640 培地中で培養した。IP-10 発現に及ぼすIFN 類の有効量を決定するため、10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>又は10<sup>4</sup> IU/ml の組換えヒトIFN- $\alpha$  (rhIFN- $\alpha$ , シグマ, St. Louis, ミズリー州、米国), 組換えヒトIFN- $\gamma$  (rhIFN- $\gamma$ , Upstate biotechnology, Lake Placid、ニューヨーク州、米国) 又は組換えウシIFN- $\tau$  (rbIFN- $\tau$ , Katakura Industries Co., Inc.) でもって単球を処理した。37°C、5% CO<sub>2</sub>-95%空気条件下でもって20時間維持した後、培養液を集めて、-70°Cで保存した。一方、細胞は直ぐさま全RNA 抽出のため処理された。加えて、ヒツジの子宮の上皮細胞及び間質細胞(stroma cell) (Johnson G.A. et al., Biol. Reprod., 61: 1324-1330 (1999)) を40ユニット/ml のペニシリン, 40  $\mu$ /ml のストレプトマイシン及び10% FCS を添加したダルベッコズ改良イーグルズ培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM) 中で培養した(前記細胞は、Dr. Bazer, Texas A&Mよりの贈与物である)。

発情周期15日目のヒツジからの子宮内膜組織(おおよそ600 mg湿重量/ 培養皿) は、40ユニット/ml のペニシリン及び40  $\mu$ g/mlのストレプトマイシンを添加したDMEMの20 ml 中で培養し、10<sup>2</sup> IU/ml のrhIFN- $\alpha$ , rhIFN- $\gamma$ 又はrbIFN- $\tau$ の何れかにより処理した。これらのIFN 類の濃度は、上記の単球についての有効量についての実験により決められたものである。37°C、5% CO<sub>2</sub>含有空気条件下でもって20時間維持した後、培養液及び子宮内膜組織はそれぞれ別々に凍結し、その後のウェスタンブロット及びノーザンブロット分析のために-70°Cで保存した。

## 〔ヒツジIP-10 のクローニング〕

妊娠17日目のヒツジの子宮内膜RNA及び発情周期15日目のヒツジの子宮内膜RNAを使用し、Akopyants N. S. et al., Proc Natl Acad Sci USA., 95:13108-13113 (1998) に記載の方法に従って、cDNAライブラリーの構築並びにサブトラクション実験を遂行した。数多くのcDNAサブトラクション試験から、ヒツジIP-10 をコードしているcDNA断片を同定し、次に5'-RACE, 3'-RACE並びに完全長PCR 法(Kuraishi T. et al., Biochem J., 347:579-583 (2000))を使用して完全長のIP-10 cDNAを取得した。完全長のIP-10 cDNAのPCR 産物は、ベクターpCRII™ (Invitrogen) に組み込み、Perkin-Elmerシーケンサー(model ABI Prism 377 XL, ロッシュ・モレキュラー・システムズ, Branchburg, ニュージャージー州、米国) を使用して自動配列解析にかけた。ヒツジIP-10 cDNAの塩基配列は、Genetyx software program (Software Development Co., Ltd、東京、日本) により解析した。

## 〔プローブの作成及びRT-PCRによる半定量解析〕

ヒツジのIFN- $\tau$ 、IP-10 及びG3PDH に対して特異的なcRNAプローブを調製するため、子宮内膜組織RNA 又は胚仔組織RNA からRT-PCRを使用してそれぞれのcDNAを調製した。すなわち、先ず全RNA 試料をSuperScriptII™ (Invitrogen) 及びオリゴ-dT プライマー(20  $\mu$ l 反応液容量) でもって逆転写し、表1に示したプライマーを使用してPCR により増幅せしめた。

表 1

Name		Sequence	Length (bp)
oIP-10	Foward	5' -CACTCCTCAACTCTTCAGGC-3'	262
	Reverse	5' -CCATTCCCTTTTCATTGTGGC-3'	
oCXCR3	Foward	5' -GCATCAGCTTCGATCGGTAC-3'	283
	Reverse	5' -GATGCGGGCGTAGCAATAGG-3'	
oIFN- $\tau$	Foward	5' -CATCTTCCCATGGCCTTCG-3'	603
	Reverse	5' -TGATCTCAAAGTGAGTTCAG-3'	
oIFN- $\gamma$	Foward	5' -CGATGAAATACACAAGCTCC-3'	504
	Reverse	5' -GATTACATTGATGCTCTCCG-3'	
oG3PDH	Foward	5' -ATGGGGAAGGTGAAGGTCGG-3'	901
	Reverse	5' -ATGTGGGCCATGAGGTCCAC-3'	
	Foward	5' -ATGGGGAAGGTGAAGGTCGG-3'	149
	Reverse	5' -ATGTGGGCCATGAGGTCCAC-3'	

表1は、PCR に使用されたプライマーセットを示すもので、表中 Name はプライマーセットでPCR 増幅の対象とされた遺伝子の名称、Sequenceは、使用プライマーの塩基配列、Lengthは、増幅対象遺伝子の鎖長をそれぞれ示している。

RT-PCRにより得られた断片のそれぞれは、ベクターpCRII<sup>TM</sup>にサブクローニングし、次に自動配列解析に付した。BLAST ネットワークプログラム (National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD, USA)を使用して配列を比較したところ、正しいヒツジのcDNAであることを示していた。ノーザンブロット解析のため、DIG-標識cRNAプローブを、T7 RNAポリメラーゼ又はSP6 RNAポリメラーゼを使用して上記cDNA構築物から作成した(Kuraishi T. et al., Biochem J., 347:579-583 (2000))。

オリゴヌクレオチドプライマー (表1) を使用してPCR 増幅して子宮のIFN- $\gamma$  mRNA 及び CXCR3 mRNA の量を測定した。IFN- $\gamma$ /G3PDH又はCXCR3/G3PDH に対するプライマー対を含有しているそれぞれの反応液にRT用鋳型(1 $\mu$ l)及びAmpliTaq Gold<sup>TM</sup> (1.25ユニット; Roche Molecularf Systems) を添加し、最終の容量を

25  $\mu$ l にして反応を行った。それぞれのPCR 産物を直線的に与えるようなプライマー対の比率を決定した。該比は、IFN- $\gamma$ :G3PDHでは 6:1で、CXCR3:G3PDH では 5:2であった。PCR の条件は、次の通りであった：最初に95°Cで11分間加熱し、次に95°Cで1 分間、57°Cで1 分間、そして72°Cで1 分間のサイクルを40サイクルを行った。そして最後に72°Cでの延長反応を5 分間行った。PCR 産物は、Quantity one v3.0 ソフトウェアを備えたイメージ解析システム（ToYoBo、大阪、日本）を使用して定量した。

#### 〔ノーザンブロット解析〕

幾つかの子宮内膜や胚仔の組織や細胞からの全RNA をIsogen (Nippon Gene, 東京) を使用して単離した。また、PBMCから単離した全RNA からpoly(A)<sup>+</sup>RNA を取得した (TaKaRa、東京、日本)。これらのRNA は1.0%アガロース-ホルムアルデヒドゲル上の電気泳動により分離し、ナイロン膜 (Biodyne-B; Pall, East Hills, ニューヨーク州、米国) に転写した。該ナイロン膜を65°Cで1.5 時間、5 x SSC, 50%ホルムアミド, 50 mM PBS, 7% SDS, 0.1% N-ラウロイルサルコシン, 50  $\mu$ g/mlサケ精子DNA (ssDNA) 及び 2% ブロッキング試薬 (Roche Diagnostics, Mannheim, ドイツ) を含有するハイブリダイゼーションバッファ中でプレハイブリダイゼーションを行い、次にcRNAプローブと一緒に新しいハイブリダイゼーションバッファ中で63°Cで12時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、該ナイロン膜を 2 x SSC-0.1% SDS でもって65°Cで30分間洗浄処理を一回行い、0.1 x SSC-0.1% SDSでもって65°Cで30分間洗浄処理を二回行って、次に37°Cで1 時間 RNase-A (20  $\mu$ g/ml) と共にインキュベーションした。該ナイロン膜を室温で1 時間 ブロッキングバッファ (1%ブロッキング試薬) 中でインキュベーションし、ついで抗DIG 抗体 (1:10,000希釈、Roche Diagnostics, Mannheim, ドイツ) を添加した。該ナイロン膜を 100 mM マレイン酸 (pH 7.5), 150 mM NaCl及び0.3% Tween 20 中で10分間の洗浄処理を3 回行い、最後に 100 mM Tris-HCl (pH 9.5) 及び100 mM NaCl 液中でリンスした。CSPD試薬 (1:100 希釈; Roche Diagnostics, Mannheim, ドイツ) を含有する100 mM Tris-HCl (pH 9.5) 及び100 mM NaCl 液中でケミルミネッセンス反応を実施し、X 線フィルムを露光

せしめて該ナイロン膜を解析した。

〔in situ ハイブリダイゼーション〕

in situ ハイブリダイゼーションを、公知の方法 (Kanai Y. et al., J Cell Biol., 133:667-681 (1996)) に少し改変を加えて行った。すなわち、切片 (10  $\mu$  m) 化した凍結組織をシランコートされたスライド上にのせ、PBS 中 4% パラホルムアルデヒドで固定化した。スライド切片は順次 0.2N HCl 及び Tris-HCl (pH 7.6) 中の 20  $\mu$ g/ml proteinase K、4% パラホルムアルデヒド、そして 0.2% グリシンでもって前処理した。次に切片は 50% ホルムアミド、5 x SSC, 1 x Denhardt's, 100  $\mu$ g/ml ヲパリン, 10 mM DTT, 10% デキストランサルフェート, そして 0.1 mg/ml の変成された tRNA 及び ssDNA を含有しているプレハイブリダイゼーション液で処理し、次に DIG 標識されたアンチセンス及びセンス cRNA プロブとともに 45°C で 16 時間 ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、42°C で 20 分間 4 x SSC でもって 1 回洗い、次に切片を 37°C で 30 分間 RNase-A (10  $\mu$ g/ml) と共にインキュベーションし、65°C で 30 分間 2 x SSC でもって 2 回洗い、次に 65°C で 30 分間 0.1 x SSC でもって 2 回洗った。該スライドをブロッキング試薬 (Boehringer Mannheim) によりブロッキング処理し、次にアルカリホスファターゼ標識化抗 DIG 抗体 (Boehringer Mannheim) と共にインキュベーションした。5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェート及びニトロブルーテトラゾリウム (Promega, Madison, WI、米国) でもってシグナルを検出した。

〔組換えヤギ IP-10 の発現及び精製〕

ヒツジ IP-10 と同様のプライマーセットを用いた RT-PCR により、ヤギ IP-10 (caprine IP-10; cIP-10) cDNA をヤギの子宮内膜の RNA から増幅した。該 cDNA は、プラスミド pSTBlue (商品名、TaKaRa) にクローニングせしめた。成熟 cIP-10 の領域をコードしている塩基配列を PCR 増幅せしめ、発現ベクター pET-14b (商品名、Novagen, Madison, WI、米国) にクローニングせしめた (cIP-10 の N-末端側にヒスチジンタグを有しており、得られた発現ベクターは、pET-14b-cIP-10 と呼称した)。該得られた発現ベクターでもって大腸菌 BL21-SI (Invitrogen) を形質転換

せしめ、培養後菌体を収穫して、50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 500 mM NaCl及び10 mM イミダゾール(pH 7.4)に懸濁し、氷上で超音波による破碎処理を行った。遠心して細胞破碎物及び不溶性タンパク質を除去した後、上澄液中のcIP-10についてSDS-PAGEで調べた。組換えcIP-10はニッケルキレート化カラム(Hi-trap Chelating HP, Amersham Pharmacia Biotech)を使用したクロマトグラフィーシステム(AKTA, Amersham Pharmacia Biotech)により精製した。イミダゾールグラジエント(20-500 mM)によりカラムからタンパク質を溶出せしめ、PBS に対して透析処理し、イミダゾールを除いた。

#### [ウエスタンブロット解析]

子宮内膜組織をインビトロ培養した後及び組換えIP-10 を産生せしめた後、その培養液試料並びに透析されたタンパク試料をウエスタンブロットで分析して、IP-10 が存在するか否を調べた。該培養液試料 (40  $\mu\text{l}$ )あるいは組換えタンパク質試料(50 ng/40  $\mu\text{l}$  又は200 ng/40  $\mu\text{l}$ )をSDS サンプルバッファ中で5分間煮沸処理し、還元条件下 15% SDS-PAGE ゲル上の電気泳動にかけ、ニトロセルロースメンブレン (Immunobilon; Millipore, Bedford, MA, 米国) に転写した。該ニトロセルロースメンブレンを室温で1時間 Block Ace (大日本製薬、大阪) でもってブロッキング処理し、次に4℃で12時間ヒトIP-10 に対するマウスモノクローナル抗体(Genzyme/Techne, Minneapolis, MN、米国) あるいはヒスチジンタグに対するウサギポリクローナル抗体(Sigma) と共にインキュベーションした。インキュベーション後、メンブレンを TBS-Tween 20 液中で3回(それぞれ10分間) 洗浄処理し、室温で1時間ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識されたロバ抗マウスあるいは抗ウサギ IgGと共にインキュベーションし、次にTBS-Tween 20液中で3回(それぞれ15分間) 洗浄処理した。SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrateキット (Pierce, Pockford, IL, 米国) によりバンドを検出処理した。



## 〔免疫組織化学的分析〕

子宮内膜組織及び胚仔組織の双方を含んでいるヒツジの子宮全体を 4% パラホルムアルデヒド中で固定化し、パラフィンに包埋し、6  $\mu\text{m}$  の切片とした。脱パラフィン化した後、切片は 0.01 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に浸し、121  $^{\circ}\text{C}$  で 15 分間オートクレーブ処理した。切片を室温で 1 時間 4.5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  のメタノール液中でインキュベーションし、湿度を高めたチャンバー内で 1 時間 Block Ace と共にインキュベーションした。次に、一次抗体、すなわち、マウスの抗ヒト IP-10 モノクローナル抗体 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Genzyme/Techne) あるいはウサギポリクローナル抗ヒト IFN- $\gamma$  (500  $\text{ng}/\text{ml}$ ; Peprotech, London、英国) と一緒に切片を 4  $^{\circ}\text{C}$  で一晩インキュベーションした。本インキュベーション後、切片を二次抗体 (Vectastain ABC Kit; Vector Labs, Burlingame, CA、米国) でもって 1 時間処理し、ついで室温で 30 分間 PBS 中でアビジン-ビオチンコンプレックスと一緒にインキュベーションした。Metal Enhanced DAB Substrate キット (Pierce) により切片に結合している抗体を可視化した。等しい濃度の正常マウスあるいはウサギ IgG を非特異的結合 (ネガティブコントロール) を評価するために同じ組織のセミシリアル切片に使用した。組織切片は次にヘマトキシリンでカウンター染色せしめられた。

## 〔in vitro ケモタキシスアッセイ〕

96 穴の修飾ボイデンチャンバー (96 well-modified Boyden chamber; NeuroProbe, Cabin John, MD、米国) 内でポリビニルピロリドンを含まないポリカルボネート製メンブレン (5  $\mu\text{m}$  の孔径、NeuroProbe) (これは、使用前に 2 時間 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ウシ血漿フィブロネクチンでコートせしめられた) を使用して PBMC の移動について調べた。アッセイは、Gasperini S. et al., J. Immunol., 162:4928-4937 (1999) に記載の方法にすこし改変を加えた方法で実施した。すなわち、ケモタキシス用チャンバーのウェルの下部に、FCS を含まない DMEM、組換え IP-10 (0.2 ~ 500  $\text{ng}/\text{ml}$ ) を含有する同じ培地、あるいは IFN- $\tau$  で処理したあるいは処理していない子宮内膜の培養物の上清液を加えた。該チャンバーのウェルの上部に、FCS を含まない DMEM 中の PBMC ( $5 \times 10^6$  個/ $\text{ml}$ ) を添加した。チャンバーを 37  $^{\circ}\text{C}$  で 5%  $\text{CO}_2$

O<sub>2</sub>含有空気雰囲気でもって2時間培養した後、メンブレンを取り除いて、PBS で洗い、固定化した後、Dif-Quick で染色した。下側の層に移動した細胞の数をランダムに選ばれた六つのhigh power fields のもとで顕微鏡下にカウントした。

ブロック実験としては、IFN- $\tau$ あるいは5 ng/ml の組換えIP-10で刺激された子宮内膜から得られた上清液を30  $\mu$ g/mlの抗IP-10 IgG あるいはコントロールのマウスIgG とともにチャンバーの上層部に添加する前に37°Cで1時間プレインキュベーションした。それぞれ独立に3回アッセイを行った。

#### 〔統計学的解析〕

それぞれのデータポイントは互いに独立な3つの試料を示し、平均 $\pm$ SEM として表した。これらのデータは one-way ANOVA、そして次に Duncan's multiple rangeテストを使用して分析された。加えて、妊娠ヒツジが集められたノーザンブロットデータは最小二乗法を用いて回帰分析により分析された。P < 0.05 の値をもつ差異はすべて有意なものとした。

### 結果

#### 〔IP-10 cDNAのクローニング〕

妊娠17日目に集められた子宮内膜組織からヒツジIP-10 のcDNA断片を得て、5'-RACE 及び 3'-RACEにより完全長のヒツジIP-10 cDNAをクローニングした。得られたヒツジIP-10 cDNAは、102 個のアミノ酸残基からなるオープンリーディングフレーム(ORF)を持っている 1172 bpを有しているものであった。図1に、クローニングされて単離されたヒツジIP-10 の塩基配列及びそれから推定されるアミノ酸配列を示す。図1において、102 個のアミノ酸に相当するオープンリーディングフレームを有する 1172 bpのcDNA配列 (GenBank™ Accession No. AB070717)が示されており、該コードアミノ酸配列 (ヒツジIP-10; GenBank™ Accession No. BAB63958) のうち、1～9 番目までのアミノ酸配列部分はシグナルペプチドと推定される。

また、cIP-10 cDNA は、ヒツジIP-10 cDNAからデザインされたプライマーセットを使用したRT-PCRによりヤギ子宮内膜RNA からクローニングされた。cIP-10 c

DNA は、99番目の残基がヒツジIP-10 のグルタミンからヤギIP-10 のアルギニンになっていることを除いては同じ102 個のアミノ酸からなるものをコードするものであった。

各種の動物間でそのアミノ酸配列を比較解析した結果を図2に示す。4 個のシステイン残基は、ケモカインファミリーにおいて保存され、その最初の2 個のシステイン残基は一個のアミノ酸残基により分けられてC-X-Cとなっている。このシステインモチーフはヒツジIP-10 cDNA及びヤギIP-10 cDNAから推定されるアミノ酸残基の中に見いだすことができる。該C-X-Cケモカイン類は該最初の2 個のシステイン残基よりも前に位置するグルタミン-ロイシン-アルギニン(ELR) モチーフが存在するか否かにより二つのクラスに分けられている(Rollins B. J., C hemokines, 90: 909-928(1997))。他の動物のものと同様にヒツジIP-10 は、該ELRモチーフを欠いており、ヒトIP-10 と高い類似性、すなわちそれぞれヌクレオチド配列では82.7% 及びアミノ酸配列では75.5% の相同性を示している(表2)。

表 2

	Nucleotide Sequence (%)			
	Ovine	Caprine	Human	Mouse
Ovine		98.7	82.7	75.2
Caprine	98.0		82.3	75.2
Human	75.5	75.5		74.4
Mouse	67.3	67.3	67.3	

表2中、Ovine はヒツジ、Caprine はヤギ、Human はヒト、Mouse はマウスを示し、Amino Acidは、アミノ酸配列について、Nucleotide Sequence は、塩基配列について、それぞれその相同性(同一性)の程度を表す。

〔着床期におけるIP-10, CXCR3, IFN- $\tau$ 及びIFN- $\gamma$  mRNAの発現の変動〕

妊娠14日目、17日目、20日目、25日目及び30日目の子宮のIP-10 mRNA量をノーザンブロット解析により調べた(図3)。図3は、ヒツジ子宮におけるIP-10 mRNAの発現レベルを示すもので、その図3左側に妊娠している雌ヒツジ(3頭、14, 17, 20, 25及び30日目)の子宮、発情周期雌ヒツジ(15日目, n=3)の子宮及び17日目の胚仔(Con)におけるIP-10 mRNAについての結果が示されている。図3左側には、独立した3つのプロットのうち一つを示してある。図3右側に示されたシグナルの比率IP-10/G3PDHはすべてのノーザンブロット実験の結果より求めたもので、各棒線は平均値 $\pm$ SEMを示している。図3右側における\*は、発情周期15日目の子宮についての値と比較しての統計的な違い( $p<0.05$ )を表す。IP-10 mRNAと妊娠日についての回帰分析の結果は、 $y=-51.5x^2 + 288.2x - 131.2$  ( $R^2=0.823$ ,  $p<0.01$ ) というものであった。

その結果はヒツジIP-10 cDNAクローニングの結果と一致するもので、妊娠している雌ヒツジの子宮内膜でIP-10 mRNAに対応する単一の転写産物(およそそのサイズ 1.1 kb)を検出した。IP-10 mRNAの発現は、発情周期雌ヒツジと比べると妊娠14日目、17日目、20日目及び25日目ではかなり高いものであった。IP-10 のレセプターである子宮内膜CXCR3 mRNAの発現は、17日目及び20日目の妊娠している雌ヒツジにおいてより高いものであった(図4)。図4は、CXCR3 mRNAの発現レベルを示すもので、その図4左側に妊娠している雌ヒツジ(3頭、14, 17, 20, 25及び30日目)の子宮及び発情周期雌ヒツジ(15日目, n=3)の子宮におけるCXCR3 mRNAとG3PDH mRNAの半定量的PCRの結果を示す。そこでは独立した3つの解析のうち一つを示してある。図4右側は、CXCR3 mRNAとG3PDH mRNAの半定量的PCR産物についての濃度解析した結果が示され、G3PDH mRNAに対するCXCR3 mRNAの量(CXCR3 mRNA/G3PDH mRNA 比)として示してある。各棒線は平均値 $\pm$ SEMを示している。該図4右側中の\*は、発情周期15日目の子宮についての値と比較しての統計的な違い( $p<0.05$ )を表す。CXCR3 mRNAと妊娠日についての回帰分析の結果は、 $y=-8.9x^2 + 45.8x + 61.4$  ( $R^2=0.431$ ,  $p<0.01$ ) というものであった。

次に、図5に、着床期間のヒツジの胚仔と子宮におけるIFN- $\tau$ とIFN- $\gamma$ の量を調べた結果を示す。図5の左側(A)には、妊娠している雌ヒツジ(3頭、14、17及び20日目)の胚仔におけるIFN- $\tau$  mRNAについてのノーザンブロット解析の結果が示され、右側(B)には、妊娠している雌ヒツジ(3頭、14、17、20、25及び30日目)の子宮、発情周期雌ヒツジ(15日目, n=3)の子宮及び17日目の胚仔(Con)におけるIFN- $\gamma$  mRNAとG3PDH mRNAの半定量的PCRの結果が示されており、そこには独立した3つの解析のうち一つが示してある。図5の右下側には、IFN- $\gamma$  mRNAとG3PDH mRNAの半定量的PCR産物についての濃度解析した結果が示され、そこではG3PDH mRNAに対するIFN- $\gamma$  mRNAの量(IFN- $\gamma$  mRNA/G3PDH mRNA比)として示してある。各棒線は平均値 $\pm$ SEMを示している。\*は、発情周期15日目の子宮についての値と比較しての統計的な違い( $p<0.05$ )を表す。IFN- $\gamma$  mRNAと妊娠日についての回帰分析の結果は、 $y=-10.6x^2 + 56.6x + 81.3$  ( $R^2=0.762$ ,  $p<0.01$ ) というものであった。

IFN- $\tau$  mRNAの発現は、胚仔中で検出され、この発現のレベルは14日目の胚仔においてより高いものであった(図5 A)。IFN- $\gamma$  mRNAの発現は、妊娠している雌ヒツジ並びに発情周期の雌ヒツジの子宮内膜で検出され、この発現のレベルは14日目、17日目、20日目及び25日目の妊娠している雌ヒツジにおいてより高いものであった(図5 B)。

#### [IP-10 及びIFN- $\gamma$ タンパク質の分布]

IP-10 及びIFN- $\gamma$ の細胞内の局在部位を調べるため、発情周期15日目の雌ヒツジ及び妊娠17日目の雌ヒツジから調製された子宮及び胚仔組織切片について免疫組織化学解析を実施した(図6)。図6において、発情周期15日目の雌ヒツジ(左側 A-C) 及び妊娠17日目の雌ヒツジ(右側 D-F) についてほぼ一連の切片として示してある。写真A及びDは、IP-10について、写真B及びEは、IFN- $\gamma$ について、そして写真C及びFはコントロールである。

IP-10 及びIFN- $\gamma$ の双方のタンパク質は、胚仔及び妊娠している子宮の管腔上皮、腺上皮、上皮下間質に局在していた。発情周期中の雌ヒツジの子宮内膜においては検出されたIFN- $\gamma$  タンパク質の量は妊娠している雌ヒツジにおけると同様

であった(図6)。IP-10タンパク質は発情周期中の子宮内膜において見いだされたが、その染色の程度は最小のものであった。

#### 〔IP-10 mRNAの分布〕

ヒツジ子宮内膜中のIP-10 mRNAの細胞内の産生場所を決定するため、発情周期15日目の雌ヒツジ及び妊娠17日目の雌ヒツジから調製された子宮組織切片における *in situ*ハイブリダイゼーションを行った(図7A)。図7において、写真a及びbは、妊娠17日目の雌ヒツジ子宮内におけるIP-10 mRNAの局在をDIG標識アンチセンスIP-10 cRNAを用いて示し、写真cは、妊娠17日目の雌ヒツジ子宮内におけるIP-10 mRNAをDIG標識のセンスcRNAで解析し、写真dは、発情周期15日目の雌ヒツジ子宮内におけるIP-10 mRNAの局在をDIG標識アンチセンスIP-10 cRNAで解析した。

妊娠している子宮の上皮下間質にはIP-10 mRNAが検出されたが管腔上皮及び腺上皮には検出されなかった。より強度を高めて行った場合には、免疫細胞にもシグナルが存在するように見えた。発情周期の子宮ではIP-10 mRNAの発現は検出されなかった。加えて、ノーザンブロット解析をIP-10を発現している組織及び／又は細胞のタイプを同定するために行った。IP-10 mRNAは単球細胞から抽出されたRNAに見出されたが、リンパ球細胞、上皮細胞や間質細胞からのRNAには見出されなかった(図7B)。

#### 〔IP-10発現に及ぼすIFN- $\tau$ の作用効果〕

IFN類につき、単球細胞におけるIP-10 mRNA発現の誘導刺激に対するその活性及び有効量を調べた。雌ヒツジから単離された単球細胞を  $10^2 \sim 10^4$  IU/ml のIFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 又はIFN- $\tau$ の存在下又は非存在下に *in vitro* で20時間培養した。図8に幾つかのIFN類がIP-10 mRNAの量に対して及ぼす効果を調べた結果を示す。図8Aには、IFN類により刺激された単球細胞におけるIP-10 mRNA発現につきそのIFN添加量を変えて見たときの結果が示されており、そこでは独立した3つのノーザンブロット解析結果のうちの 하나가示してある。

IFN類はすべてヒツジ単球細胞においてIP-10 mRNAの発現を刺激できたが、そ

の有効量はこれらIFN間で異なっていた(図8A)。IFN- $\tau$ は、 $10^2$  IU/mlの量でIP-10 mRNAの発現を刺激し、それは他のIFN類よりも有効性の高いものであった。

発情周期の状態の雌ヒツジで、子宮内膜のIP-10 mRNAの量がIFN類の影響を受けているか否かを調べた。発情周期15日目の雌ヒツジから得られた子宮内膜の体外移植片を $10^2$  IU/mlのIFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、あるいはIFN- $\tau$ の存在下又は非存在下に *in vitro* で20時間培養した。IFN刺激された子宮内膜組織から抽出された全RNAにつきIP-10 mRNAをノーザンブロット解析でもって調べた。コントロール並びにIFN- $\alpha$ 刺激あるいはIFN- $\gamma$ 刺激された試料でわずかながらIP-10 mRNAが検出されたが、IFN- $\tau$ で刺激された後においてのみ高いレベルのIP-10 mRNAが検知された(図8B)。また、子宮内膜でのIP-10の産生はIFN- $\tau$ により刺激を受けていることがウエスタンブロット解析により示された(図8C)。

図8Bには、発情周期の状態の雌ヒツジからの子宮内膜移植片についてIFN類がIP-10 mRNAの量に及ぼす効果が示してある。図8Bの左側は、 $10^2$  IU/mlのIFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、あるいはIFN- $\tau$ で刺激した時の子宮内膜移植片でのIP-10 mRNAについてのノーザンブロット解析の結果を示し、そこでは独立した3つのノーザンブロット解析結果のうちの 하나가示してある。図8Bの右側には、IP-10 mRNA及びG3PDH mRNAについてのノーザンブロットを濃度解析した結果が示してあり、シグナルの比率IP-10/G3PDHはすべてのノーザンブロット実験の結果より求めた。各棒線は平均値 $\pm$ SEMを示している。\*は、IFNを添加しないで培養した移植片についての値と比較しての統計的な差異( $P < 0.05$ )を表す。また、図8Cには、IFN類により刺激された子宮内膜移植片の培養培地中のタンパク質につきウエスタンブロット解析した結果が示されている。

#### [PBMCの移動に及ぼすIP-10の作用効果]

組換えヤギIP-10(rcIP-10)及び子宮内膜で誘導・分泌されたIP-10が生物学的に活性を持つものであるのか否かを確認するため、*in vitro* ケモタキシスアッセイをしてPBMCに対する走化性、遊走性をrcIP-10やIFN- $\tau$ で刺激された子宮内膜より分泌された分泌物が持っているか否かを調べた。組換えcIP-10をニッケル

キーレティング カラムを用いて精製し、IP-10 及びヒスチジントグに対する抗体を用いたウェスタンブロットにより検出した（図 9 A）。PBMCにIP-10 受容体CXCR3 のmRNAが存在することを確認した（図 9 B：レーンT は全RNA 10  $\mu$ g、レーンM は poly(A)<sup>+</sup> RNA 2  $\mu$ g を示す）。ケモタキシスアッセイの結果、PBMC は 0.2~5ng/mlのrcIP-10 に応答していたが、その反応はより高濃度のrcIP-10 においては減少した。その結果、特徴的なベル形状の用量応答曲線（図 9 C）となった。IFN- $\tau$ で刺激された子宮内膜組織培養物からの培地はPBMCに対し顕著なケモタクティック活性を示したが、一方非処理の子宮内膜から得られた培養液では効果はなかった（図 9 C）。各棒線は平均 $\pm$ SEM、\*はIFN- $\tau$ 非処理子宮内膜培養培地でのPBMC移動からの値(P<0.05)であり、\*\*はrcIP-10 不存在におけるPBMC移動からの値(P<0.05)を示す。免疫中和試験の結果、抗IP-10 抗体はrcIP-10 及びIFN- $\tau$ で刺激された子宮内膜からの培養液のケモタクティック活性を60~70%を減少せしめ、これはIFN- $\tau$ で刺激された子宮内膜からの培養液により示されるケモタクティック活性は主にIP-10 によるものであることを示している（図 9 D）。各棒線は平均 $\pm$ SEM、\*は P<0.05での抗IP-10 抗体非存在下におけるIFN- $\tau$ 処理子宮内膜培養培地におけるPBMCの移動値であり、\*\*は P<0.05における抗IFN- $\tau$ 非存在下におけるIP-10 によるPBMCの移動値を示す。

#### [考察]

本発明により、ヒツジIP-10 は、妊娠子宮内に存在し、発情周期の子宮にはほとんど存在していないことが明らかにされた。IP-10 は、C-X-C型ケモカインの一員に属するものである。このケモカインファミリーは、IP-10 のレセプターであるCXCR3 及び／又は白血球のサブセットに対するケモタクティック活性を介して様々な炎症反応や免疫応答を制御している（Farber J.M. et al., J Leukoc Biol., 61:246-257 (1997)）。さらに、本発明はIFN- $\tau$ の存在下において子宮内膜培養培地はIP-10 を含有していること、これら培地の上清はPBMCの移動を誘導すること、また抗IP-10 抗体によってその活性が70%まで阻害されたという事実に基づいている。



本発明では、単球を使用した用量に対する応答試験により、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 及びIFN- $\tau$ が、IP-10 mRNAの発現を刺激することができることを示したが、また、該活性に及ぼす有効量はIFN類の間で異なっていることを示すことにも成功している。IFN- $\tau$ は、 $10^2$  IU/ml の量で単球でIP-10の発現を効果的に刺激することができるが、一方、rhIFN- $\gamma$ はそれと同じ用量では有効ではなかった。rhIFN- $\gamma$ によるIP-10 mRNAの発現刺激が低いのが、IFN- $\gamma$ が他のIFN類と比較して高度に種特異性を持っている (Pestka S. et al., Ann. Rev. Biochem., 56:727-777 (1987))ということによるか否かは明らかにされてはいない。しかしながら、高用量のrhIFN- $\gamma$  ( $10^4$  IU/ml)は単球でIP-10 mRNAの発現を刺激することができるとの結果に注意しなければならない。すなわち、rhIFN- $\gamma$ によりIP-10 を効果的に誘導することができなかったのは、その活性がなかったことによるものではない。子宮内膜のIP-10 mRNAの発現パターンは着床期の胚仔、IFN- $\tau$  mRNAのレベルに続いて発現しているようにみえるもので、IP-10 発現の変動は、例えば、MCP-1やMCP-2 といった他の子宮内膜のケモカイン類と類似している。

in situ ハイブリダイゼーションにおいて、上皮下間質の領域にIP-10 mRNAを観察した。そして免疫細胞においてそのシグナルがあるようであった。ヒト及びマウスにおけるこれまでの研究(Luster A. et al., Nature, 315:672-676 (1985); Ohmori Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 168:1261-1267 (1990))で単球によりIP-10が分泌されていることが、そして本発明でIP-10がヒツジ単球において発現されているが、リンパ球、上皮細胞、及び間質細胞では発現していないことが見出された。加えて、MCP mRNAも上皮下間質に偏在しており、MCP陽性細胞は好酸球である(Asselin E. et al., Biol Reprod., 64:992-1000 (2001))。これらの観察結果は、上皮下間質に偏在しているIP-10は常在性のマクロファージ及び／又は該領域に集められたマクロファージによって産生されていることが示唆された。上皮下間質の領域にIP-10タンパク質が局在していることに加えて、IP-10は子宮の管腔上皮や腺上皮にも存在していた。胚仔においては、極くわずかなIP-10 タンパク質が検出されたが、IP-10 mRNAは検出されなかった。上皮下領域のマクロファージにより産生されたIP-10は表面の上皮の中に拡

散してゆき、それはCXCR3発現免疫細胞を着床部位に移動させることを誘引することが示唆される。

結論として、本発明により、ヒツジの子宮において着床期の間にはIP-10 及びIFN- $\tau$  mRNAの経時的、細胞特異的に意味のある発現があること、そして胚仔のIFN- $\tau$ では子宮内膜のIP-10 の発現を制御する能力があることを示しており、IFN- $\tau$ により制御されたIP-10 が反芻動物における着床期には免疫細胞の補充及び／又は再分配に重要な役割を果たしているとの可能性を提供している。

本発明により、IP-10とIFN- $\tau$ との間の関係並びに子宮におけるIP-10の機能を解明する途が開拓されているものである。

## 実施例 2

### 〔動物組織の調製〕

発情周期14日目と17日目、及び妊娠14日目、17日目及び20日目のヤギの子宮をイソフルレン麻酔下に摘出した。発情周期14日目、及び妊娠14日目及び17日目のヤギから摘出した全適子宮をin situ ハイブリダイゼーション分析用に凍結した。妊娠14日目及び17日目、及び発情周期14日目及び17日目のヤギの子宮を灌流処置し、胚仔の単離や灌流液の収集用とした。PBS(15ml)を該子宮に穏やかに注入させ、収集した子宮灌流液を濃縮 (Macrosep、Pall Corporation、East Hills、NY) し、IP-10検出のウエスタンブロット分析に使用した。胚仔組織は妊娠14日目(全胚仔)、17日目(胚仔の約半分)及び20日目(トロホブラスト部分のみ)のヤギから採取し、in vitro培養した。妊娠17日目及び20日目の胚仔の残存部分はRNA抽出及び免疫染色用に凍結した。In vitro培養培地はIFN- $\tau$ の検出用ウエスタンブロット分析に使用した。上皮細胞は発情周期14日目のヤギの子宮から単離した。IFN- $\tau$ の IP-10産生刺激効果の試験用に発情周期14日目のヤギの子宮内膜外植片を培養した。胚仔を取り除いたヤギ子宮内膜組織は凍結しRNA抽出に使用した。

## 〔In vitro培養〕

全胚仔（14日目、 $n = 3$ ）及び細片化した胚仔（17日目及び20日目、約200mg/培養皿、各 $n = 3$ ）を Imakawaらの方法（Endocrine（1995），3，511-517）に基づいた条件下に培養した。

子宮内膜上皮細胞の分離及びその特徴づけは Takahashiらの方法（J. Reprod. Dev.（2001）47，181-187）により行った。発情周期14日目のヤギの子宮角を0.76%のEDTA-PBSで満たし、37°Cで1時間ブレインキューベートした。子宮内膜上皮を外科用ナイフで擦り取り、0.1%のコラゲネース（Sigma、St. Louis、MO）中で37°C、8分間インキューベートした。細胞懸濁液をナイロンメッシュ（70  $\mu$ m）に通し、密度勾配遠心分離法にかけた。回収した上皮細胞を40 units/mlのペニシリン、40  $\mu$ g/mlのストレプトマイシン及び10% FCSを加えたDulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12（DMEM/Ham's F12、Sigma）中に再懸濁した。該細胞をブタ皮タイプIコラーゲン（Nitta gelatin、大阪、日本）でコートした24穴プレートに添加し、細胞が増殖飽和した段階で接着試験（adhesion assay）を行った。

17日目のヤギ胚仔から細胞を分離した。該胚仔は細片化し、0.2%のコラゲネース（Sigma）で37°C、30分間インキューベートした。該細胞をナイロンメッシュ（70  $\mu$ m）に通し、抗生物質を含有するDMEMに再懸濁し、直ちにケモタキシスアッセイあるいは接着試験に使用した。更に、ウシB-細胞（KU-1、33）及びヤギトロホブラストクローン細胞（HTS-1、33）を10-20%のFCS及び抗生物質を含有するDMEM（Sigma）中でインキューベートした。

発情周期14日目のヤギ子宮内膜組織（約600mg wet weight/培地皿）を抗生物質を含有する20mlのDMEM中で培養し、5 nMの組換えウシIFN- $\tau$ （rbIFN- $\tau$ 、Katakura Industries Co., Inc.、東京、日本）で処理した。37°C、5% CO<sub>2</sub>含有空気条件下に24時間培養後、子宮内膜組織を凍結し、RNA抽出及びノーザンブロット分析に用いるため-70°Cに保存した。

## 〔ヤギIP-10及びCXCR3 cDNAのクローニング〕

実施例1と同様にRT-PCRを利用してヤギ子宮内膜のRNAからヤギIP-10及びCX

CR3のcDNAを増幅し、pSTBlue ベクター (TaKaRa、東京、日本) にサブクローニングしてパーキナーエルマーシークエンサー (モデルABI Prism 377 XL、Roche Molecular system、Branchburg、NJ) を使って自動塩基配列分析を行った。ヤギIP-10及びCXCR3 の塩基配列比較をBLAST ネットワークプログラム(National Center for Biotechnology Information、NIH、Bethesda、MD) を用いて行った結果、GenBank 登録番号AB099892及びAB099893を得た。

〔CXCR3発現プラスミドのトランスフェクション〕

ヤギCXCR3 のオープンリーディングフレームをコードしている塩基配列を PCR 増幅し、哺乳類発現ベクターpcDNA3.1 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) にクローニングした。得られたプラスミドを Transfast™ (Promega, Madison, WI) によりその使用説明書にしたがってKU-1細胞及びHTS-1細胞に導入した。導入 2 日後の細胞をケモタキシス又は接着試験に使用した。

〔組換えヤギIP-10及びそれに対する抗体の作製〕

ヤギIP-10(cIP-10) の全配列をコードしているヌクレオチド配列cDNAを PCR増幅し、cIP-10のN-末端にヒスチジン-タグを組み込んでいる発現プラスミドpET-14b(Novagen, Madison, WI) にクローニングした。得られた発現ベクター、pET-14b-cIP-10で大腸菌BL21-SI(Invitrogen) 細胞を形質転換し、一夜培養した。培養細胞を集め、50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、500mM NaCl 及び10mMイミダゾール(pH7.4) に再懸濁し、氷冷下音波破碎した。遠心分離により細胞片及び不溶性タンパク質を除去した後、上清中の組換えcIP-10(rcIP-10) をSDS-PAGEにより検出した。組換えcIP-10をニッケル-キレートカラム(Hi-trap Chelating HP, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Buckinghamshire, UK) を使用してクロマトグラフィーシステム(AKTA, Amersham Pharmacia Biotech Inc.) により精製した。目的のタンパク質をカラムからイミダゾール(20-500mM)濃度勾配溶離した後PBS で透析しイミダゾールを除去した。

200  $\mu$ g のrcIP-10 タンパク質を含むPBS をフロイント完全アジュバント(Sigma) と混合しウサギ(n=2) に皮下注射した。rcIP-10 タンパク質を2週間毎に更

に2回注射した。最後の注射の1週間後に抗体価を調べ、次の日に全血採取した。抗-ヤギIP-10 抗体をHitrap Protein G column (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) を用いて抗血清から精製した。

#### [SDS-PAGE及びウェスタンブロット分析]

プロテインアッセイキットII(Protein assay kit II; Bio-Rad, Hercules, CA) を使用してタンパク質濃度を測定した後、培養培地(3~8  $\mu$ l、10  $\mu$ gタンパク質/レーン、n=3)、濃縮子宮フラッシング培地(10  $\mu$ gタンパク質/レーン、各日n=3)または組換えIP-10(50または200ng/レーン)をNagaokaらの方法(Biol. Reprod. (2003) 68, 1413-1421)に従ってウェスタンブロット分析を行った。タンパク質検体はSDSサンプルバッファー中で5分間煮沸し、還元条件下で10%または15%のSDS-PAGEゲルにて電気泳動した後ゲルをクマシーブルーで染色した。ウェスタンブロット用にゲル上のタンパク質をニトロセルロース膜(Immobilon, Millipore, Bedford, MA)に転写した。該膜を室温で1時間、ブロックエース(Block Ace : 大日本製薬、大阪、日本)でブロック処理した後、ヒツジIFN- $\tau$ に対するウサギポリクローナル抗体(1:5000、Dr. Bazerからの贈呈)、ヒスチジン-タグ(Sigma)またはヤギIP-10(1:1000)と共に4℃で12時間インキュベートした。インキュベーション後、該膜をTBS-Tween 20で3回洗浄し、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGロバ抗体(Amersham Pharmacia Biotech Inc.)と室温で1時間インキュベートし、TBS-Tween 20で3回洗浄した。バンドはECL ウェスタンブロッティング検出試薬(Amersham Pharmacia Biotech Inc.)を使用して検出した。

#### [RT-PCR分析]

Isogen (ニッポンジーン、東京、日本)を使って、子宮内膜組織、胚仔組織及び培養細胞(それぞれn=3)から全RNAを抽出した。全RNA検体はまずSuperScriptII (Invitrogen)及びoligo-dTプライマー(20  $\mu$ l 反応液容量)により逆転写した。CXCR3、XCR1及びインテグリンレセプターのmRNA量はオリゴヌクレオチドプライマー(表3)を使ってPCR増幅により測定した。

表 3

Name	Sequence of foward and reverce primer	Length (bp)
CXCR3	5'-GCATCAGCTTCGATCGGTAC-3' 5'-GATGCGGGCGTAGCAATAGG-3'	283
XCR1	5'-ATGGAGCCCTCAGACATCCC-3' 5'-GAGGATCTCCACGTAGCAGA-3'	627
Integrin $\alpha 5$	5'-TGCTGTGAACCAGAGTCGTC-3' 5'-ATCCACTGCACAGCTGTGGC-3'	809
Integrin $\alpha V$	5'-GAAGCAGGAAAGAGAGCCTG-3' 5'-CTATATCCGTGGCTCCTTTC-3'	890
Integrin $\beta 1$	5'-CTCAAATCCAGCCACAGCAG-3' 5'-CCAGCGAAGTGAAACACAGC-3'	523
Integrin $\beta 3$	5'-AGATTGGAGACACGGTGAGC-3' 5'-GTACTTGAAAGTGATCTTGC-3'	392
Integrin $\beta 5$	5'-GTCTGAAGATTGGGGACAGC-3' 5'-GGTACACGCTCTGTTCTCC-3'	285
G3PDH	5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCGG-3' 5'-ATCATATTGGAACATGTAAA-3'	150

プライマーペアによる各反応はRTテンプレート(1  $\mu$ l)及びAmpliTaq Gold(0.625 U; Roche Molecular System)により最終容量25  $\mu$ lで行った。全PCR 反応は、95°Cで1分間、60°Cで1分間、及び72°Cで1分間のサイクルを40サイクル行い、最後に72°Cで12分間反応させた。アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイドによる可視化後、PCR 産物は、Quantity One(v3.0 software; PDI, Inc., Huntington Station, NY)を備えたイメージ解析システム (ATTO Corp., 東京、日本) を使用して定量した。

#### 〔ノーザンブロット分析〕

ノーザンブロット分析はNagaoka らの方法(Biol. Reprod. (2003) 68, 1413-1421)に従って行った。DIG 標識cRNAプローブはT7 またはSP6 RNA ポリメラーゼ (Promega) を使ってIP-10 及びCXCR3 cDNAプラスミドから作製した。IP-10 mRNA の検出には全RNA を使用し、CXCR3 mRNAの試験にはポリ(A)<sup>+</sup> RNA を使用した。Oligotex-dT30(TaKaRa) を使用してPBMCから単離した全RNA からポリ(A)<sup>+</sup> RNA を取得した。全RNA(20  $\mu$ g/レーン、各n=3)あるいはポリ(A)<sup>+</sup> RNA (2  $\mu$ g/レーン、各 n=3) を電気泳動により分離し、ナイロン膜(Biodyne-B; Pall Corpora

tion) に転写した。該ナイロン膜にcRNAプローブを63℃で12時間ハイブリダイズさせた後、DIG検出システムを用いてシグナルを検出した。

#### 〔免疫蛍光検査法〕

凍結胚仔組織切片 (10  $\mu$ m、各試験日それぞれ n=3) をシラン-コートスライド上に載せ、アセトンで固定した。非特異的結合をブロックするためにBlock Ace で室温、1時間処理した後、スライドをヒトCXCR3 に対するマウスモノクローナル抗体 (10  $\mu$ g/ml、R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) または正常マウスIgG (Sigma) と4℃、12時間インキュベートした。一次抗体との反応後、スライドをFITC結合抗-マウスIgG ヤギ抗体 (15  $\mu$ g/ml、Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA) で室温、1時間処理した。細胞核をヨウ化プロピジウム (2  $\mu$ g/ml、Sigma) で染色し、デジタル画像を共焦点レーザー顕微鏡 (FV300、OLYMPUS、東京、日本) に記録した。

#### 〔タンパク質のビオチン化及び検出〕

組換えcIP-10タンパク質を EZ-連結ビオチン化試薬 (Pierce、Rockford、IL) を使用してビオチン化した。コントロールとして組換えGST 及び組換えヤギリンホタクチン-GST (lymphotactin-GST) タンパク質をビオチンで標識した。ビオチン化はこれらのタンパク質を0.3mg/ml EZ-連結ビオチン化試薬の1mlと共にPBS中で氷冷下2時間インキュベートして行なった。インキュベーション後、透析して未反応のビオチンを除去した。タンパク質濃度を測定し、ビオチン化タンパク質 (2  $\mu$ g/レーン) を還元条件下15%のSDS-PAGEゲルで展開しホースラディシュペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) により可視化し、標識効率を確認した。

凍結胚仔組織切片 (10  $\mu$ m、それぞれ n=3) をシラン-コートスライドに載せ、アセトンで固定化した。スライドをBlock Ace で室温、1時間ブロック処理した。ビオチン化タンパク質 (100  $\mu$ g/ml) と室温で1時間インキュベートした後、スライドをホースラディシュペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (1:5000、Amersham Pharmacia Biotech Inc.) と室温で1時間、反応させた。ビオチン化

タンパク質の組織への結合をDAB 溶液(Sigma) を使って可視化した。組織切片をヘマトキシリンにより対比染色した。

#### [ケモタキシスアッセイ]

KU-1細胞、HTS-1細胞及び初代トロホプラスト細胞の遊走活性を96ウェル-修飾ボイデンチャンバー(modified Boyden chamber; NeuroProbe、Cabin John、MD) 内でポリビニルピロリドンを含まないポリカルボネート膜(5 $\mu$ m ポアサイズ、NeuroProbe) を使って調べた。該ポリカルボネート膜は予め10 $\mu$ g/mlのウシ血漿フィブロネクチン(和光純薬、大阪、日本) によりコートして使用に供した。アッセイはNagaoka らの方法(Biol. Reprod. (2003) 68, 1413-1421) にしたがって行った。すなわち、ケモタキシス用チャンバーのウェルの下部にrcIP-10 の所定量を含有するDMEM-0.1%BSA (フェノールレッド及びFCS 不含) を添加し、チャンバーのウェルの上部に細胞(5 $\times 10^6$  cells/ml) を含有するDMEM-0.1%BSA (フェノールレッド及びFCS 不含) を添加した。チャンバーを37 $^{\circ}$ C、5 %CO<sub>2</sub> 含有空気雰囲気下で2時間インキュベーション後、膜を取り除き、PBS で洗浄、固定化後、Dif-Quick (国際試薬、神戸、日本) で染色した。下層へ移動した細胞の数を無作為に選んだ6つの領域において顕微鏡下でカウントした。阻止試験は、チャンバー下部への添加前にrcIP-10 を抗-IP-10抗体またはコントロールウサギIgG(Sigma)と37 $^{\circ}$ C、1時間プレインキュベーションして行った。これらの試験はそれぞれ3回ずつ行った。

#### [接着性試験]

24-穴プレートにタイプI コラーゲン(Nitta gelatin) またはフィブロネクチンを10 $\mu$ g/ml濃度で室温、2時間コートするか、あるいはヤギ上皮細胞を貼り付ける。PBS で3回洗浄後、プレートを1%BSA で室温、30分間ブロック処理した。HTS-1細胞または初代トロホプラスト細胞を細胞内蛍光色素、カルセイン-AM(calcein-AM; Molecular Probes Inc., Eugene、OR) 4 $\mu$ M と37 $^{\circ}$ C、30分間標識反応させた。PBS で3回洗浄した後、細胞を所定量のrcIP-10 と37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させ、各ウェルに添加し、プレートを37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。イン



キューベーション後、PBS で3回洗浄し、ウェルに結合しなかった細胞を除去し、ウェルに結合した細胞を1%Triton X-100、10%エタノール含有PBS で処理した。細胞の蛍光を蛍光読取装置（励起フィルター485nm、発光フィルター535nm）（ARVO™ SX 1420 Multilabel Counter、PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA）を使って測定した。阻止試験は、rcIP-10 を30  $\mu$ g/mlの抗-IP-10抗体またはコントロールウサギIgG(Sigma)と37°C、1時間ブレインキューベーションして行った。フィブロネクチンへの細胞の接着性に対するIP-10 の関与について更に調べるために、50mMのGly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys(GRGDSPK、Sigma)合成ペプチド、そのコントロール、Arg-Gly-Glu-Ser(RGES、Sigma)、または5 mMのEDTAを細胞及びrcIP-10 とブレインキューベーションした。これらの試験はそれぞれ3回ずつ行った。

#### 〔統計学的解析〕

光学密度（ウェスタンブロット）及び光度（RT-PCR）の測定は、統計学的解析システム（version 6.0；SAS Institute、Cary, NY）の一般線形モデルを採用した最小二乗法（LS）ANOVA で行った。G3PDH のPCR 産物の光度はRT-PCR分析の共変量として使用した。ケモタキシスアッセイでは、遊走あるいは処理により付着した細胞の数は、未処理の細胞と比較した数として算出し、前述のように統計学的に解析して求めた。LS-ANOVAに用いられているモデルは変動値の母集団として処置及び複製を含んでいる。図中に描かれた最小二乗平均(LSM)及び標準誤差(S. E.)は、この解析から得られた。

#### 〔組換えヤギIP-10タンパク質及びそれに対する抗体の作製結果〕

pET-14b-cIP-10プラスミドで形質転換された大腸菌BL21-SI に組換えヤギIP-10(rcIP-10)を発現させ、His-Tag を利用して精製し、SDS-PAGEにより確認した。ニッケルキレートカラムによる細胞溶解物の精製前（レーン1）と精製後（レーン2）のSDS-PAGEの結果を図10Aに示す。抗-His-Tag抗体（レーン1）及び抗-ヤギIP-10 抗体（レーン2）による精製rcIP-10 タンパク質（50及び200ng/レーン）のウェスタンブロット分析の結果を図10Bに示す。特異的なバンドが約14

kDa のところに見られた。

rcIP-10 の生物学的活性を調べるために、in vitroケモタキシスアッセイをやギCXCR3 cDNAを導入したウシB-細胞株 KU-1 細胞を使用して行った。遺伝子の導入された細胞によるCXCR3 mRNAの発現をノーザンブロット分析により確認した。RNA はpcDNA3.1-やギCXCR3 (CXCR3) 或いは親のベクターpcDNA3.1 (Mock) が導入されたKU-1細胞から抽出した (図10C、左)。CXCR3 に対するrcIP-10 の生物学的活性をCXCR3 を発現している (○) および発現していない (□) KU-1細胞を用いてケモタキシスアッセイにより調べた。各棒線はLSM±S. E. を示している。アッセイの結果は、CXCR3 トランスフェクト細胞が1-20ng/ml のrcIP-10 に対し常に応答したことを示していた。更に高濃度のrcIP-10 に対しては応答の度合いが低下しており円錐形の用量反応曲線を示した (図10C、右)。更に、免疫中和試験として20ng/ml のrcIP-10 を添加したKU-1細胞によるケモタキシスアッセイを行った (図10D)。アッセイは抗体無添加 (—)、30  $\mu$ g/mlの抗-やギIP-10 抗体で前処理 (anti IP-10) 及びコントロールとしてウサギIgG で前処理 (control IgG)により行った。アスターリスク(\*)は有意差(P<0.05)を示す。免疫中和試験では、抗-rcIP-10抗体がrcIP-10 のケモタキシス活性を低減することを示した。

#### [妊娠初期におけるやギ子宮内IP-10の発現]

妊娠14日目、17日目及び20日目のやギ胚仔由来の培養培地 (10  $\mu$ gタンパク質/レーン) におけるIFN- $\tau$ をウェスタンブロット分析により調べた。IFN- $\tau$  タンパク質産生は妊娠17日目で最も高濃度を示した (図11A)。子宮内膜IP-10 mRNAのノーザンブロットの結果を図11Bに示す。妊娠やギ (パネル左) の胚仔 (17日目: Con)、子宮内膜 (14日目: D14、17日目: D17、20日目: D20) 及びrc IFN- $\tau$ で24時間刺激した発情周期やギ (14日目、パネル右) からのRNA (20  $\mu$ g/レーン) を1.2%アガロースゲルで電気泳動した。ノーザンブロット分析の結果は、やギ子宮内膜のIP-10 mRNAのレベルが妊娠17日目から上昇してくること、及び胚仔因子IFN- $\tau$ がin vitroで発情周期14日目の子宮内膜におけるIP-10 mRNAレベルを刺激していることを示した (図11B)。IP-10 タンパク質はウェスタンブロ

ット分析により発情周期及び妊娠14日目、17日目のヤギ（それぞれ  $n=3$ ）子宮灌流溶液中（ $10\mu\text{g}$  タンパク質/レーン）に検出された（図11C、左）。IP-10 のウェスタンブロットの濃度解析結果（図11C、右）の各棒線は $\text{LSM} \pm \text{S.E.}$ を示し、アスターリスク(\*)は発情周期14日目の子宮における値と比較した場合の有意差( $P < 0.05$ )を示している。妊娠17日目の子宮灌流溶液は他の試験日の培地中よりも多量のIP-10 を含有していた。ヤギ子宮におけるIP-10 mRNAのin situ ハイブリダイゼーションの結果を図11Dに示す。パネルa、b及びcはそれぞれ発情周期14日目、妊娠14日目及び17日目のヤギについてのDIG-標識アンチセンスヤギIP-10 cRNAの結果である。パネルdは妊娠17日目のヤギについてのセンスIP-10の結果である。ここで、leは管腔上皮細胞、stは間質細胞、trはトロホブラストを示し、スケールバー(—)は $50\mu\text{m}$ を示す。IP-10 mRNAが妊娠子宮内膜の上皮下間質領域に見られ、妊娠17日目の子宮内膜では発情周期14日目または妊娠14日目の子宮内膜に比べて高いレベルのIP-10 mRNAが検知された（図11D）。

#### 〔ヤギ胚仔におけるCXCR3の発現と細胞内局在〕

妊娠14、17または20日目のヤギ子宮内膜（D14、D17及びD20、 $n=3$ ）及び17日目の胚仔組織(Con、 $n=3$ )におけるCXCR3 mRNAの発現をRT-PCRにより測定した（図12A）。更に17及び20日目の胚仔（ $2\mu\text{g}$  ポリ(A)<sup>+</sup> RNA/レーン、それぞれ $n=3$ ）におけるCXCR3 mRNAの発現をノーザンブロット分析により確認した（図12B）。免疫蛍光検査分析を凍結胚仔及び抗-CXCR3抗体を用いて行った。抗-ヒトCXCR3モノクローナル抗体(a)、正常マウスIgG（ネガティブコントロール、d）、及び同一の領域の細胞核をヨウ化プロピジウムで染色(b、e)、及び抗-CXCR3抗体とヨウ化プロピジウムによる染色結果を重ねた画像(c)を図12Cに示した。スケールバーは $100\mu\text{m}$ 。トロホブラスト層に斑点状の蛍光が観察され、核とははつきり異なる局在性を示している。

#### 〔ヤギトロホブラスト細胞へのrcIP-10の結合〕

組換えcIP-10タンパク質、組換えGST及びヤギリンフォタクチン（リンフォタクチン-GST）をビオチン化し、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ストレブ

トアビジンによりビオチン化を確認した(図13A)。妊娠17日目のヤギ胚仔(Con)、子宮内膜(Endo)または末梢血単核細胞(PBMCs)におけるIP-10 レセプターCXCR3 mRNA及びリンフォタクチンレセプターXCR1 mRNA の発現をRT-PCRにより確認した(図13B)。リンフォタクチンは Cケモカインファミリーに属し、IP-10 と同様に妊娠初期のヤギ子宮内膜に発現する。しかしながら、リンフォタクチンレセプターXCR1 mRNA はCXCR3 とは異なり胚仔には検出されなかった。これらの理由により、リンフォタクチン/XCR をネガティブコントロールとして使用した。ビオチン化したタンパク質を妊娠17日目のヤギ胚仔と反応させ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンで可視化した。CXCR3 の存在はrcIP-10 とインキュベートしたトロホブラスト細胞においてのみ観測された(図13C)。スケールバーは 200  $\mu$ m。

[CXCR3を発現している胚仔細胞に及ぼす組換えcIP-10の遊走活性刺激]

図14A、左は、HTS-1 細胞(—)、空プラスミドを導入したHTS-1 (Mock)及びヤギCXCR3 cDNAを導入したHTS-1(CXCR3)から抽出したRNA のノーザンブロットの結果を示している。HTS-1 細胞のケモタキシスアッセイを行った。CXCR3 発現プラスミドでトランスフェクトされていない HTS-1 (□) はrcIP-10 に反応しなかったが、CXCR3 発現プラスミドでトランスフェクトしたHTS-1 (○) は1-20 ng/mlのrcIP-10 に対し常に応答した。rcIP-10 の濃度が上昇するにしたがって反応性は低下し、円錐形の用量反応曲線を示した(図14A、右)。CXCR3 発現プラスミドでトランスフェクトした HTS-1 (黒棒) および空プラスミドでトランスフェクトしたHTS-1(白棒) の遊走活性に対するrcIP-10 の作用を調べた(図14B)。30  $\mu$ g/mlの抗-cIP-10 抗体(Abs: IP-10)または30  $\mu$ g/mlの正常ウサギIgG(Abs: IgG) で前処理したrcIP-1(20ng/ml) をこれらHTS-1 細胞と反応させた。rcIP-10 で処理された細胞の遊走細胞数を未処理細胞の遊走細胞数で割った数を遊走細胞率とした。アスタリスク(\*)は有意差( $P < 0.05$ )を示す。抗-rcIP-10抗体がrcIP-10 のケモタキシス活性を低減することを示した。次いで、妊娠17日目のCXCR3 を発現している初代トロホブラスト細胞についてケモタキシスアッセイを行った。該トロホブラスト細胞の遊走性はrcIP-10 タンパク質によって促進され、

ケモタキシス活性は抗-IP-10抗体により中和された(図14C)。

〔フィブロネクチン及び子宮内膜上皮細胞へのトロホブラスト細胞の接着性に及ぼすrcIP-10の影響〕

コラーゲンI またはフィブロネクチンでコートした或いは何もコートされていないプレートへのrcIP-10(20ng/ml)で活性化した(+)または活性化していない(-) ヤギトロホブラスト細胞(妊娠17日目)の接着性試験の結果、フィブロネクチンをコートしたプレートへのrcIP-10 活性化細胞の接着率が非常に高かった(図15A)。阻止試験として、抗-cIP-10 抗体(IP-10) または正常ウサギIgG(Ig G)でrcIP-10 を前処理してトロホブラスト細胞のフィブロネクチンへの接着性試験を行った(図15B)。更に、50mM のRGD ペプチド(フィブロネクチンのRGD (Arg-Gly-Asp) サイトを介して起こる細胞接着を阻止する)、50mM のRGE ペプチド(不活性コントロール) または5 mMのEDTA (インテグリンシグナルのインヒビター) をトロホブラスト細胞に添加してケモタキシスアッセイを行った(図15B)。組換えcIP-10で活性化されたトロホブラスト細胞のフィブロネクチンへの接着性をRGE ペプチドは阻止しなかったが、RGD ペプチドは阻止した。EDTAもまたトロホブラスト細胞のフィブロネクチンへの接着を阻止した。

CXCR3 cDNAでトランスフェクトしたHTS-1 細胞(黒棒)は、フィブロネクチンへの細胞の接着性がrcIP-10 タンパク質により活性化され、抗-IP-10抗体によりその活性化が抑制された(図15C)。RGD ペプチドまたはEDTAの添加によりCXCR3 トランスフェクト細胞のフィブロネクチンへの接着性は抑制された(図15C)。空プラスミドでトランスフェクトした細胞(白棒)の遊走活性もまたRGD ペプチド及びEDTAで抑制された。

CXCR3 プラスミドでトランスフェクトしたHTS-1 細胞(黒棒)及び空プラスミドでトランスフェクトしたHTS-1 細胞(白棒)の子宮内膜上皮細胞に対する接着性試験を行った(図15D)。CXCR3 を発現しているHTS-1 の子宮内膜上皮細胞への接着性はrcIP-10 タンパク質によって上昇し、IP-10 に対する抗体による中和試験により阻止された。EDTA処理トロホブラスト細胞では上皮細胞に対する接着活性は失われた。RGD ペプチドは接着活性を抑制した。各棒線はLSM±S. E. を表

し、アスターリスク(\*)は有意差( $P < 0.05$ )を示す。

〔組換えcIP-10により活性化されたヤギトロホプラスト細胞におけるインテグリンサブユニットの発現〕

組換え c IP-10 により活性化されたHTS-1 細胞によるインテグリンサブユニットの発現を調べた。インテグリンサブユニット、 $\alpha 5$ 、 $\alpha V$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 及び $\beta 5$ の転写をRT-PCRにより検出した。トロホプラスト細胞におけるインテグリン $\alpha 5$ 、 $\alpha V$ 及び $\beta 3$ サブユニットmRNAの発現がrcIP-10により促進され、この促進は抗-IP-10抗体により中和された(図16)。インテグリン $\beta 1$ 及び $\beta 5$ サブユニットmRNAの発現はrcIP-10により影響されなかった。各棒線はLSM $\pm$ S. E.を表す。

以上の結果より、ヒツジと同様、ヤギの子宮において着床期の間にはIP-10及びIFN- $\tau$  mRNAの経時的、細胞特異的に意味のある発現があること、そして胚仔のIFN- $\tau$ が子宮内膜のIP-10の発現を制御する能力があることが示され、IFN- $\tau$ により制御されたIP-10が着床期に免疫細胞の補充及び／又は再分配に重要な役割を果たしている可能性が示されている。

本発明により、IP-10とIFN- $\tau$ との間の関係並びに子宮におけるIP-10の機能を解明する途が開拓される。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、IP-10が、胚が子宮に着床する現象や過程を制御することを利用する技術が提供されたことにより、母親の妊娠認識過程を制御する医薬、動物薬、治療法、活性測定法、アッセイ法、それらに使用される試薬などを提供する途を開くものである。本発明に従い、妊娠現象の調整制御が可能となり、ヒト及び家畜を含めた動物について、妊娠を確実に成功せしめたり、妊娠を防いだりすることが可能となるし、そうした目的に重要な物質や薬物の開発が容易になる。

本発明は、前述の説明及び実施例に特に記載した以外も、実行できることは明らかである。上述の教示に鑑みて、本発明の多くの改変及び変形が可能であり、従ってそれらも本件添付の請求の範囲の範囲内のものである。

## &lt;配列表フリーテキスト&gt;

SEQ ID NO: 3, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 4, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 5, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 6, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 7, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 8, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 9, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 10, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 11, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 12, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 13, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 14, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 15, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 16, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 17, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 18, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 19, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 20, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 21, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 22, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 23, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 24, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 25, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR  
SEQ ID NO: 26, Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR

## 請 求 の 範 囲

1. タンパク質IP-10 及びIP-10 において少なくとも1以上のアミノ酸残基が欠失、付加及び／又は置換されているIP-10 類縁体であって全長のIP-10 と実質的に同等又は同一の生物活性を有するIP-10 類縁体あるいはIP-10 誘導体から成る群から選ばれたものを有効成分として含有し、

(1) 胚遊走活性化剤、(2) 胚の子宮壁への着床促進剤、(3) 不妊治療剤、(4) 妊娠促進剤、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整剤、(6) 免疫細胞遊走活性化剤、及び(7) 子宮内免疫機能調整剤

から成る群から選ばれたものであることを特徴とする医薬及び／又は動物医薬。

2. IP-10 が、ヒト、ウシ、スイギュウ、ウマ、ロバ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、ブタ、シカ、トナカイ、ヤク、イヌ、ネコ、サルを包含する哺乳動物由来のものであることを特徴とする請求項1記載の医薬及び／又は動物医薬。

3. IP-10 及びIP-10 において少なくとも1以上のアミノ酸残基が欠失、付加及び／又は置換されているIP-10 類縁体であって全長のIP-10 と実質的に同等又は同一の生物活性を有するIP-10 類縁体あるいはIP-10 誘導体から成る群から選ばれたもので、試料を処理し、

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性

から成る群から選ばれた生物学的活性を得ることを特徴とする方法。

4. IP-10 及びIP-10 において少なくとも1以上のアミノ酸残基が欠失、付加及び／又は置換されているIP-10 類縁体であって全長のIP-10 と実質的に同等又は同一の生物活性を有するIP-10 類縁体あるいはIP-10 誘導体から成る群から選ばれたものを含有し、請求項3記載の方法に使用することを特徴とする試薬。

5. IP-10 活性を測定し、



- (1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性

から成る群から選ばれた生物学的活性をアッセイすることを特徴とするアッセイ。

6. 請求項5のアッセイに使用することを特徴とする試薬。

7. IP-10 及びIP-10 において少なくとも1以上のアミノ酸残基が欠失、付加及び／又は置換されているIP-10 類縁体であって全長のIP-10 と実質的に同等又は同一の生物活性を有するIP-10 類縁体あるいはIP-10 誘導体から成る群から選ばれたものをコードする塩基配列を含有する核酸を有効成分として含有し、(1) 胚遊走活性化剤、(2) 胚の子宮壁への着床促進剤、(3) 不妊治療剤、(4) 妊娠促進剤、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整剤、(6) 免疫細胞遊走活性化剤、及び(7) 子宮内免疫機能調整剤

から成る群から選ばれたものであることを特徴とする医薬及び／又は動物医薬。

8. (i) 配列表の配列番号：1で表される塩基配列のうち、少なくともオープンリーディングフレーム部分を有するもの、  
(ii) 少なくとも該(i)の配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズすることのできる塩基配列、  
(iii) 図2あるいは配列番号：2のポリペプチドと少なくとも80%の相同性を有するアミノ酸配列を持ち、且つ  
(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性

から成る群から選ばれた生物学的活性を有するかあるいは同等の抗原性を包含した、該IP-10（例えば、ヒツジIP-10）と実質的に同等の生物学的活性を有するペプチドをコードする塩基配列、

から成る群から選ばれた核酸を有効成分として含有し、

- (1) 胚遊走活性化剤、(2) 胚の子宮壁への着床促進剤、(3) 不妊治療剤、(4) 妊

娠促進剤、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整剤、(6) 免疫細胞遊走活性化剤、及び(7) 子宮内免疫機能調整剤

から成る群から選ばれたものであることを特徴とする医薬及び／又は動物医薬。

9. (A) タンパク質IP-10 及びIP-10 において少なくとも1以上のアミノ酸残基が欠失、付加及び／又は置換されているIP-10 類縁体であって全長のIP-10 と実質的に同等又は同一の生物活性を有するIP-10 類縁体あるいはIP-10 誘導体から成る群から選ばれたもの若しくはその塩又は

(B) (i) 配列表の配列番号：1で表される塩基配列のうち、少なくともオープンリーディングフレーム部分を有するもの、

(ii) 少なくとも該(i)の配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズすることのできる塩基配列、

(iii) 図2あるいは配列番号：2のポリペプチドと少なくとも80%の相同性を有するアミノ酸配列を持ち、且つ

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性

から成る群から選ばれた生物学的活性を有するかあるいは同等の抗原性を包含した、該IP-10 (例えば、ヒツジIP-10) と実質的に同等の生物学的活性を有するペプチドをコードする塩基配列、

から成る群から選ばれた核酸

の生物学的活性、例えば(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物学的活性を促進又は阻害する化合物又はその塩を含有していることを特徴とする医薬。

10. (A) IP-10 及びIP-10 において少なくとも1以上のアミノ酸残基が欠失、付加及び／又は置換されているIP-10 類縁体であって全長のIP-10 と実質的に同等又は同一の生物活性を有するIP-10 類縁体あるいはIP-10 誘導体から成る

群から選ばれたもの若しくはその塩、(B) 前記(A) をコードする核酸及び該核酸を含有するベクターあるいは該核酸又は該ベクターで形質転換された宿主細胞から成る群から選ばれたものを使用し、前記IP-10 又はIP-10 類縁体あるいはIP-10 誘導体若しくはその塩又は前記核酸の生物学的活性、例えば(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物学的活性を促進又は阻害する化合物をスクリーニングする方法又はそのためのスクリーニングキット。

11. IP-10 の産生を亢進し、不妊症の発症及び／又は進展を防ぐ化合物のスクリーニング方法又はスクリーニングキットである請求項10記載のスクリーニング方法又はスクリーニングキット。

12. 請求項10又は11記載のスクリーニング方法又はスクリーニングキットを使用してスクリーニングすることにより得られる、IP-10 産生制御化合物。

13. IP-10 、該遺伝子又は該RNA に存在し、IP-10 の活性又は発現を変化させうる変異部位の存在を検知するためのものであることを特徴とするIP-10 関連疾患用遺伝子診断薬。

14. IP-10 遺伝子、mRNA、hnRNA から選ばれたものに存在しうる変異部位を特異的に認識できる制限酵素及びそのアイソシゾマー並びにIP-10 遺伝子、mRNA、hnRNA から選ばれたものに存在しうる変異部位を含む領域を遺伝子増幅するために利用されるオリゴヌクレオチドプライマーから成る群から選ばれたものを使用することを特徴とする請求項13記載の診断薬。

15. 工程(a):核酸試料を得る工程、

工程(b):工程(a) にて得られた核酸試料を遺伝子増幅して、IP-10 遺伝子に存在しうる変異部位を含む領域が増幅された核酸断片を得る工程、及び

工程(c):工程(b) の核酸断片について、変異の存在を調べる工程を含むことを特徴とするIP-10 遺伝子関連疾患の遺伝子診断法。

16. 被検試料におけるIP-10 ポリヌクレオチドの存在量を試験し、IP-10 ポリヌクレオチドの存在量を指標に使用して、被検体における以下:

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠

促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性

の程度を判定又は診断することを特徴とする被検体における生物活性の判定又は診断方法。

17. 被検試料におけるIP-10 タンパク質の存在量を試験し、IP-10 タンパク質の存在量を指標に使用して、被検体における以下:

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性

の程度を判定又は診断することを特徴とする被検体における生物活性の判定又は診断方法。

18. IP-10ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含有する組成物であって、被検体における以下:

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性

の程度を判定又は診断するために使用するものであることを特徴とする被検体における生物活性の判定又は診断組成物。

19. (i) IP-10ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド、又は(ii) IP-10ポリヌクレオチドを備え、被検体における以下:

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性

の程度を判定又は診断するために使用するものであることを特徴とする核酸アレイ。

20. IP-10ポリヌクレオチドをPCR 増幅し、被検体における以下:

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠

促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性

の程度を判定又は診断するために使用するものであることを特徴とするプライマーセット。

21. 少なくとも以下の要素：

IP-10 を認識する抗体

からなるキットであって、被検体における以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性

の程度を判定又は診断するために使用するものであることを特徴とする被検体における生物活性の判定又は診断キット。

22. 少なくとも以下の要素：

(a) 固相化したIP-10 を認識する抗体；および

(b) 標識化した且つ上記抗体とは異なるエピトープと結合する抗体

からなるキットであって、被検体における以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性

の程度を判定又は診断するために使用するものであることを特徴とする被検体における生物活性の判定又は診断キット。

23. すくなくとも以下の工程：

(a) 被検体の生体試料をIP-10 を認識する抗体を固定化した担体と接触する工程；

(b) 該生体試料と接触せしめた固相担体を洗滌する工程；

(c) 該生体試料と接触せしめた固相担体を標識化した且つ上記抗体とは異なるエピトープと結合する抗体と接触する工程；

(d) 固相化された標識あるいは遊離である標識を測定する工程；

(e) 工程(d) で測定された標識量をIP-10 量の指標とし、正常な生体試料の結

果と比較する工程；および

(f) 正常な生体試料と比較して有意に相違するIP-10 タンパク質存在量を、以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性における異常又はそのリスクの程度を示す指標として使用する工程

を含むことを特徴とする当該生物活性に伴う異常又はそのリスクの程度を測定する方法。

24. すくなくとも以下の工程：

(a) 被検体の生体試料よりRNA を調製する工程；

(b) 工程(a) で調製されたRNA を電気泳動分離する工程；

(c) 工程(b) で分離されたRNA をIP-10 ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下で標識ヌクレオチドプローブとハイブリダイズする工程；

(d) 工程(c) でハイブリダイズしている標識量をIP-10 ポリヌクレオチド発現量の指標とし、正常な生体試料の結果と比較する工程；および

(e) 正常な生体試料と比較して有意に相違するIP-10 ポリヌクレオチド発現量を、以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性における異常又はそのリスクの程度を示す指標として使用する工程

を含むことを特徴とする当該生物活性に伴う異常又はそのリスクの程度を測定する方法。

25. すくなくとも以下の工程：

(a) 被検体の生体試料よりRNA を調製する工程；

(b) 工程(a) で調製されたRNA を鋳型にdTプライマーを使用して第1鎖cDNAを調製する工程；

(c) 工程(b) で調製されたcDNAを鋳型にIP-10 ポリヌクレオチドをPCR 増幅す

るためのプライマーセットを使用してPCR 増幅する工程；

(d) 工程(c) で得られたPCR 産物を電気泳動分離する工程；

(e) 工程(d) で分離されたPCR 産物をIP-10 ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする標識ヌクレオチドプローブとハイブリダイズする工程；

(f) 工程(e) でハイブリダイズしている標識量をIP-10 ポリヌクレオチド発現量の指標とし、正常な生体試料の結果と比較する工程；および

(g) 正常な生体試料と比較して有意に相違するIP-10 ポリヌクレオチド発現量を、以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性における異常又はそのリスクの程度を示す指標として使用する工程

を含むことを特徴とする当該生物活性に伴う異常又はそのリスクの程度を測定する方法。

26. すくなくとも以下の工程：

(a) 被検体の生体試料を組織固定化处理に付す工程；

(b) 工程(a) で調製された組織固定化標本を切片とする工程；

(c) 切片化した組織をIP-10 を認識する抗体による免疫組織染色に付す工程；

(d) 被検体の生体試料における免疫組織染色の程度を、健常のもののそれらと比較する工程；および

(e) 正常な生体試料と比較して有意に相違するIP-10 タンパク質存在量を、以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性における異常又はそのリスクの程度を示す指標として使用する工程

を含むことを特徴とする当該生物活性に伴う異常又はそのリスクの程度を測定する方法。

## 27. 以下の工程：

- (a) IP-10 ポリヌクレオチドをPCR 増幅するためのプライマーセットを使用して被検体の生体試料をPCR 増幅する工程；
- (b) (i) IP-10 ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド、又は(ii) IP-10ポリヌクレオチドを備えた核酸アレイを使用した分析に被検体の生体試料から分離した核酸分画をかける工程；
- (c) IP-10 ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドと被検体の生体試料から分離した核酸分画とをハイブリダイズする工程

から成る群から選ばれた工程のすくなくとも一つを含み、且つ被検体の生体試料におけるIP-10 ポリヌクレオチドの存在量を試験し、IP-10 ポリヌクレオチドの存在量が健常のもののそれらと比較することを含むことを特徴とする、以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性における異常又はそのリスクの程度を測定する方法。

28. 定量的にIP-10 タンパク質存在量又はIP-10 ポリヌクレオチド発現量を測定することを特徴とする請求項23～27のいずれかーに記載の、以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性における異常又はそのリスクを測定する方法。

29. 請求項23～27のいずれかーに記載の、以下：

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性における異常又はそのリスクを測定する方法において使用する、(i) IP-10を認識する抗体、(ii)



該抗体(i)とは異なるエピトープと結合する抗体、(iii)固相化した抗体(i)又は(ii)及び(iv)標識した抗体(i)又は(ii)のいずれかーに記載の抗体を含有することを特徴とする試薬。

30. IP-10 を認識する抗体を使用し、検体試料中のIP-10 タンパク質量又はIP-10 ポリヌクレオチド発現量を測定することを特徴とする以下:

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性における異常又はそのリスクの程度を測定又は診断する方法。

31. IP-10 を認識する抗体を含有し、検体試料中のIP-10 タンパク質量又はIP-10 ポリヌクレオチド発現量を測定し、以下:

(1) 胚遊走活性化、(2) 胚の子宮壁への着床促進、(3) 不妊治療、(4) 妊娠促進、(5) 胚仔と母体との間の相互作用調整活性、(6) 免疫細胞遊走活性化、及び(7) 子宮内免疫機能調整活性から成る群から選ばれた生物活性における異常又はそのリスクの程度を測定又は診断するためのものであることを特徴とする測定又は診断試薬。

1 / 1 6

cactcctcaactcttccaggcagctgagctactgcagaagtagccttcagttgcagcacc ATGAACAAAAGTGGTTT 77  
M N K S G F 6

CTTATTTTCGCCCTTATCTCTGACTCTGAGTCAAGGCATACCTCTCTAGGAAACACACGCTGCACCTGCATCGAG 155  
L I F C L I L L T L S Q G I P L S R N T R C T C I E 32

ATCAGTAAATCGATCTGTAAATCCAGGTCCTTAGAAAACCTTGAACTGATTCCTGCAAGTCAATCTGCCCCACGTGTC 233  
I S N G S V N P R S L E K L E L I P A S Q S C P R V 58

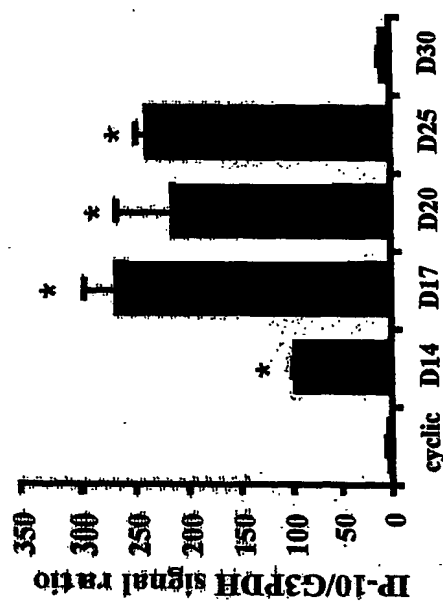
GAGATTATTGCCACAATGAAGGAATGGGAGAAAGATGTCTGAATCCAGAACTTAAGACCATCAAGAATTTACTG 311  
E I I A T M K R N G E K R C L N P E S K T I K N L L 84

AAAGCAATTAAACAGCAAGGACTAAAGATCTCTCTCGAACACAGAAAGAGGCATAA tcactgcactactgataaga 388  
K A I N K Q R T K R S P R T Q K E A \* 103

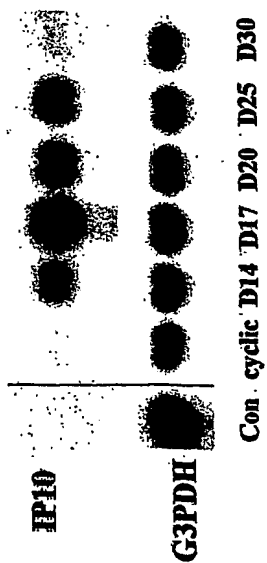
tggaccagagagaagctacacattgtttccctgtgtacagtatatgtcaagccctaatgttcgtggacttca 466  
gttctcctaaaaaggtgaccaagccagtcaccaaaccagctgactactactcctgcaggggggaggtggtcacc 544  
tgagctgttcagtagtgactctgccctggcactgtgactgaagctataccggggcgctacgttctcagttaa 622  
taagtccagcccttgctactgacagcttcttcccttcccaacttcttaggttattaaagggatcttccagctctgg 700  
gcttattagagaccccttaggatctcaataactaagagacatccaaaccaaataatgcaatctgtttttaaagaagat 778  
ctttactccaggggcttctgctccatccctccaagggggccgtattcttccaggtgttatgtacatagttccaaatat 856  
acagaagcagccagaaaatatctggaaaatgtaggtctaaacagttattacttagtcaaaaactatacaaatgagattct 934  
tgaagatataatgtttcttatatgattttcaggttccatggaataactgtatacaactatacaacttatgtaattattg 1012  
caatgggaataaaatttttaatttagatacatgttctgcaggttatgtgaagacaaatagctaaatgctttccaaaata 1090  
aaagtaatgttctctccagaaataactaagaagattatgtaattgttttagaggcccaaaaacataataataattat 1168  
aact 1172

OVINE	MNKSGLIFCLILLTL--QGIPLSRNRCTGIEISNGSVNPRSLKLELIPASQSGPRV
CAPRINE	MNTSGFLIFCLILLTL--QGIPLSRNRCTGIEISNGSVNPRSLKLELIPASQSGPRV
HUMAN	MNQTAILICCLIFLTLGSIQGVPLSRVCTGISISNQPVNPRSLKLELIPASQSGPRV
MOUSE	MNPSAAVIFCLILLGLSGTQGIPLARTVRCNGIHDDGPRMRAIGKLELIPASLSGPRV
OVINE	EIIATMKRNGEKRCLNPESKTIKNLLKAINKORTKRSPTQKEA
CAPRINE	EIIATMKRNGEKRCLNPESKTIKNLLKAINKORTKRSPTRKEA
HUMAN	EIIATMKKKGEKRCLNPESKAIKNLLKAVSKEMSKRSP-----
MOUSE	EIIATMKKNDEQRCLNPESKTIKNLLMKAFSQKRSKRAP-----

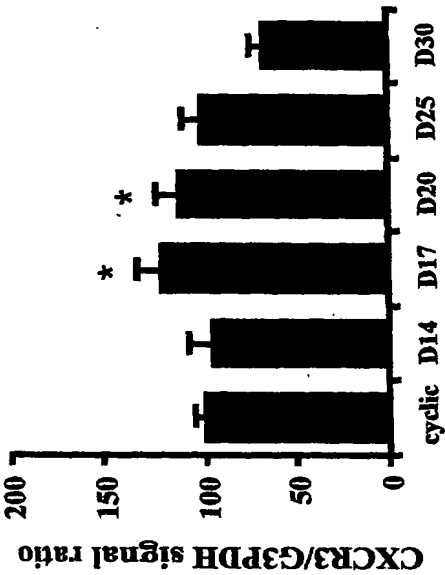
3 / 16



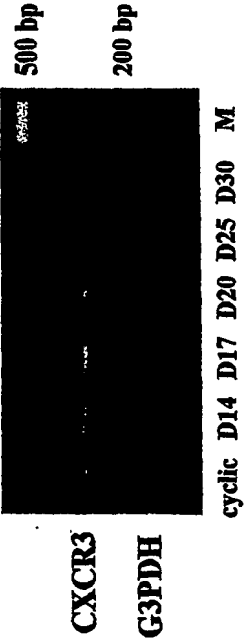
A



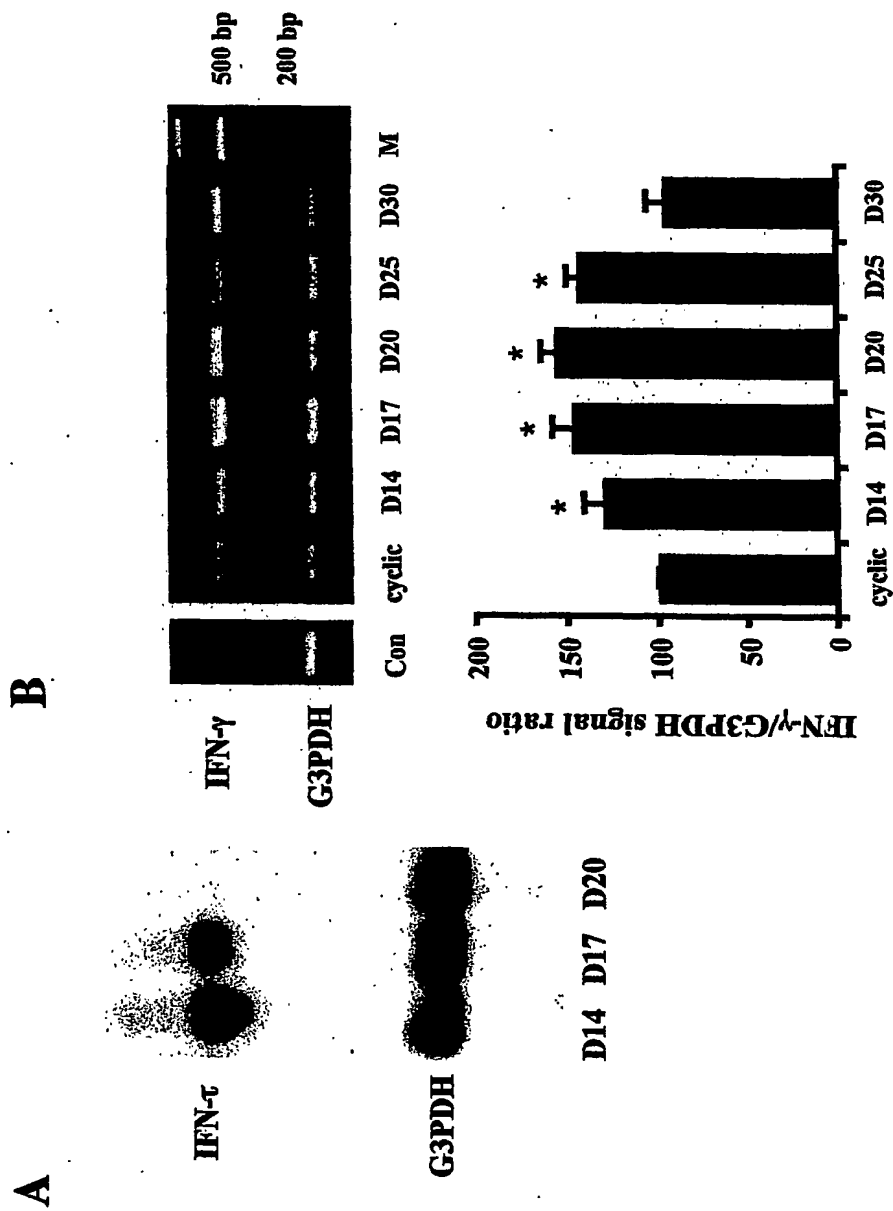
3



**B**



5 / 1 6



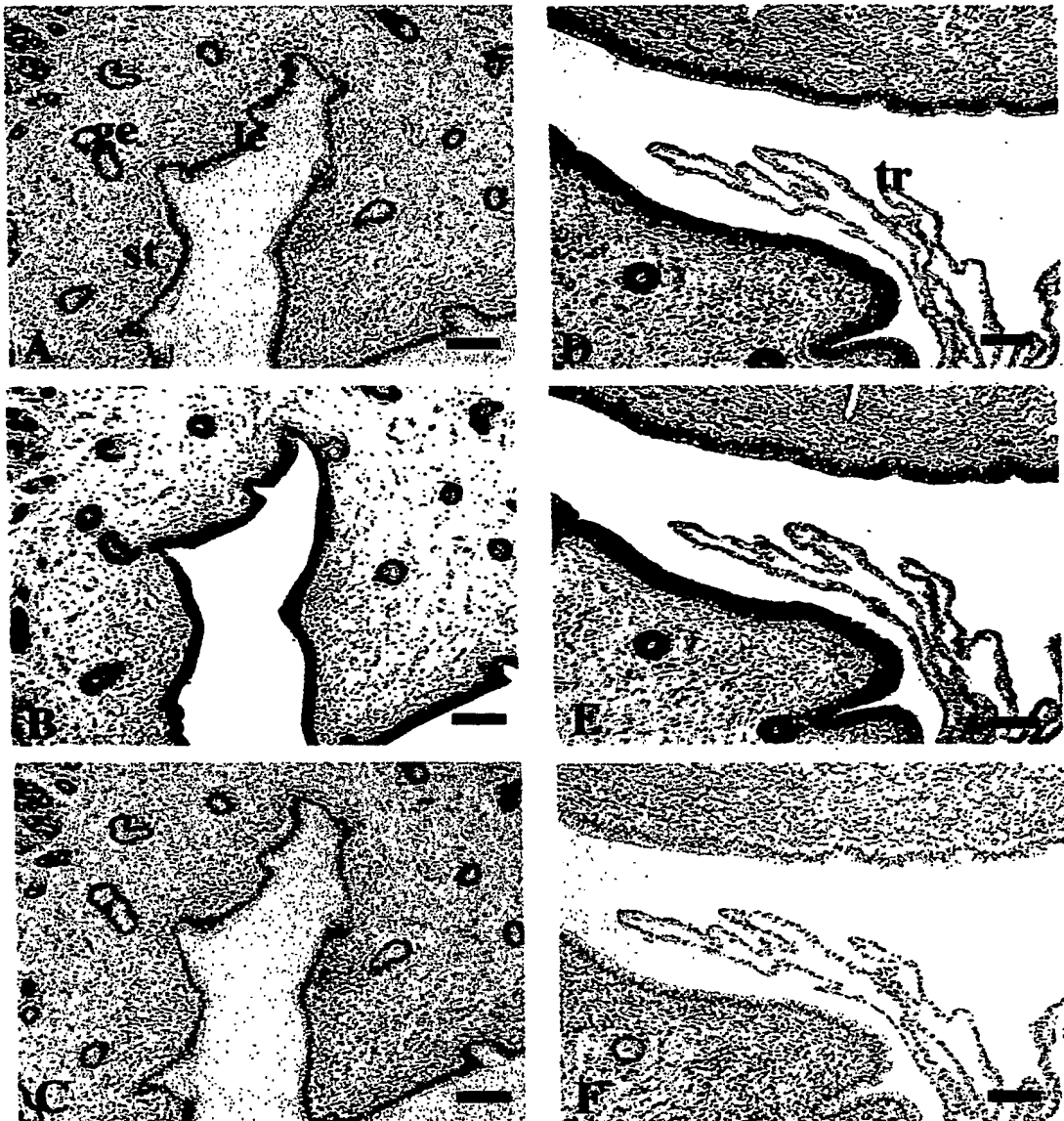
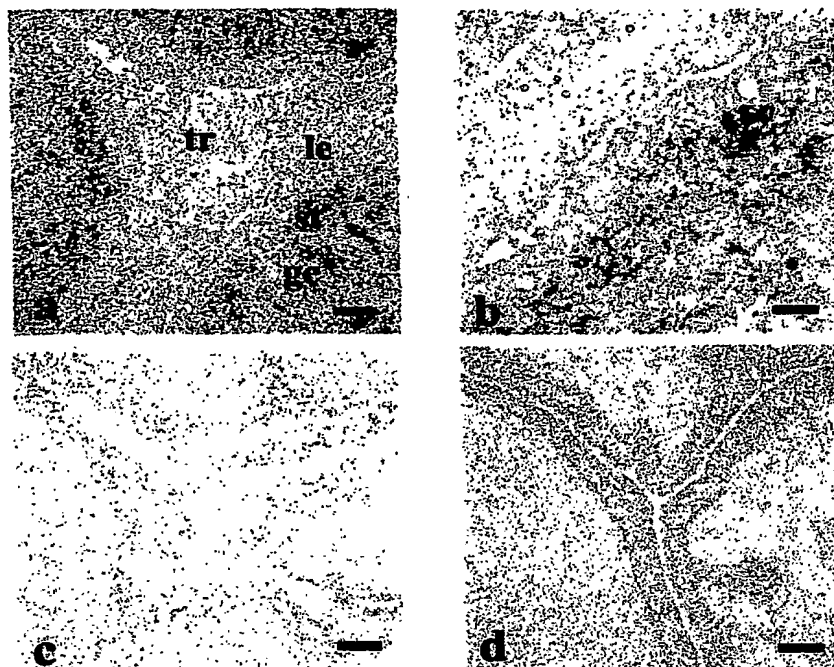


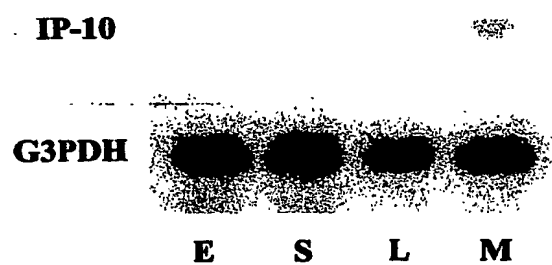
図 6

7 / 16

**A**

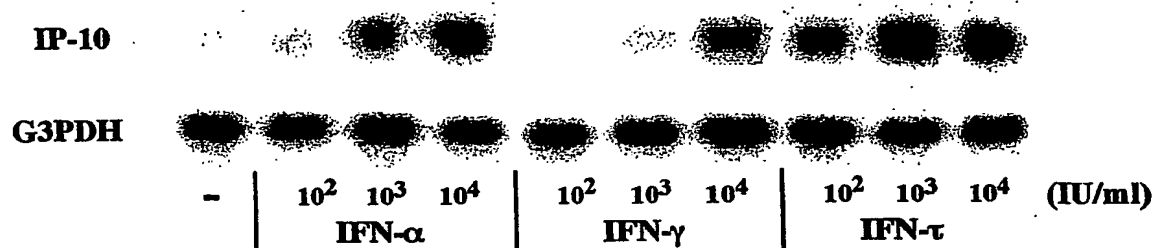


**B**

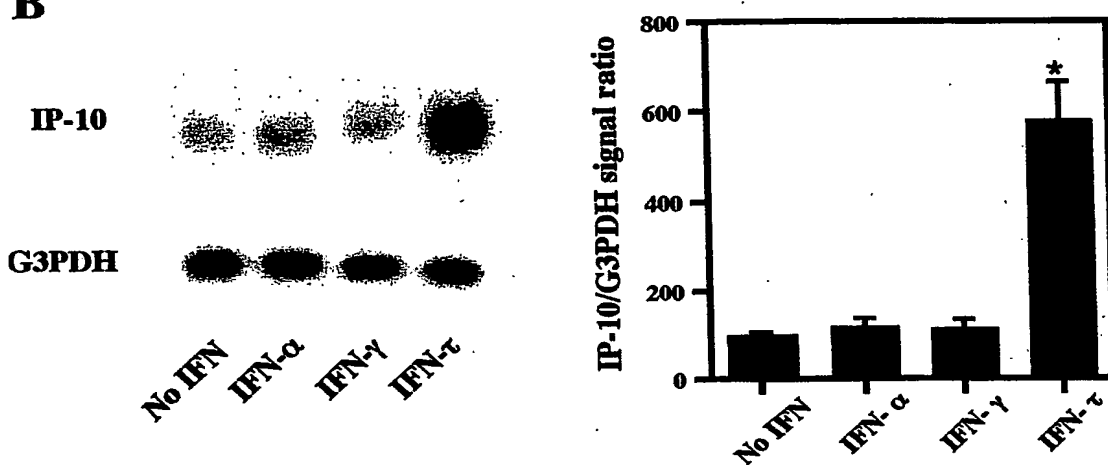




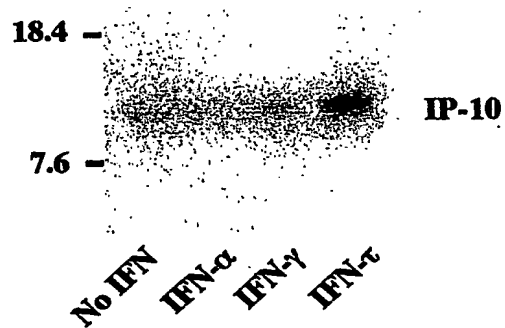
**A**



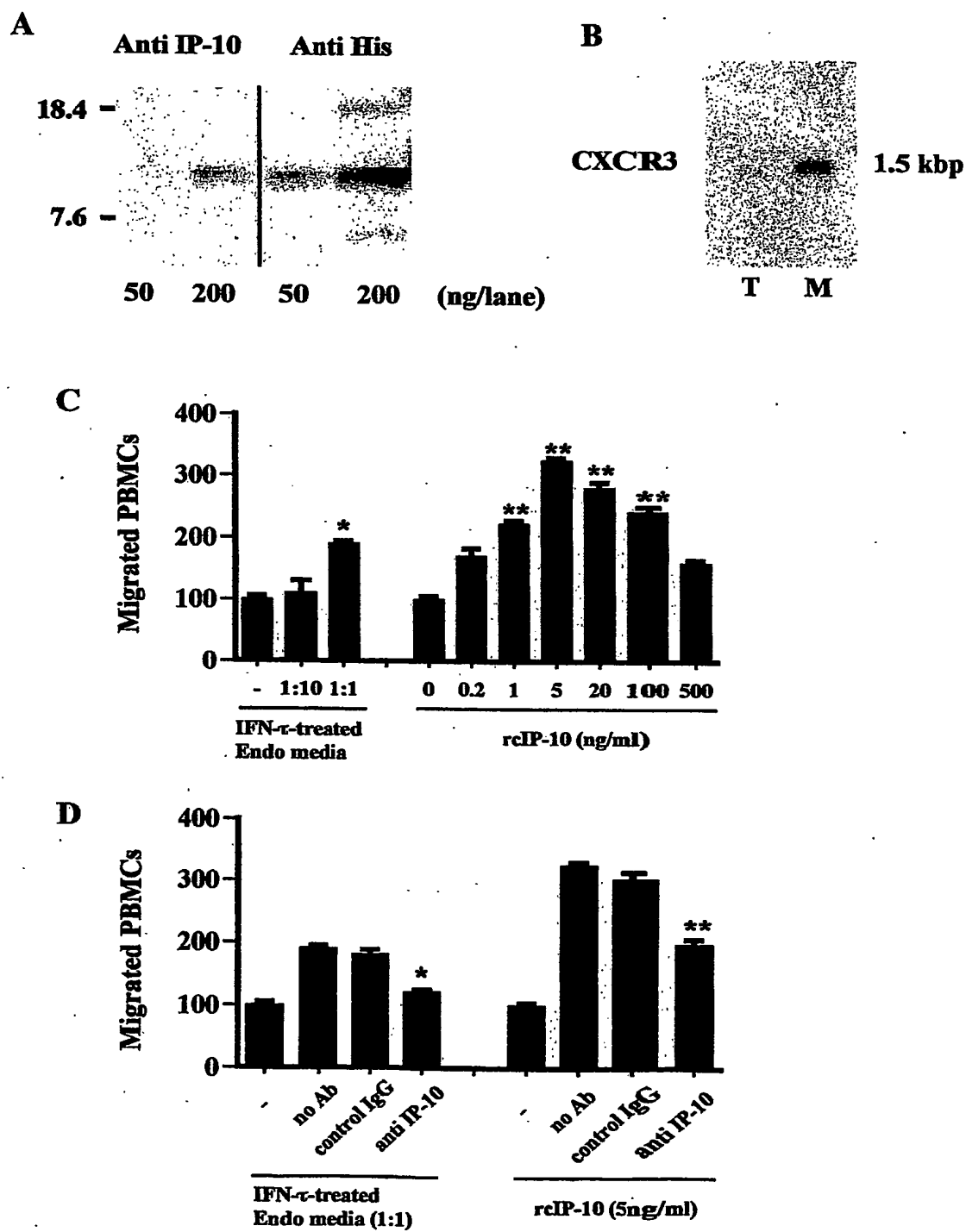
**B**



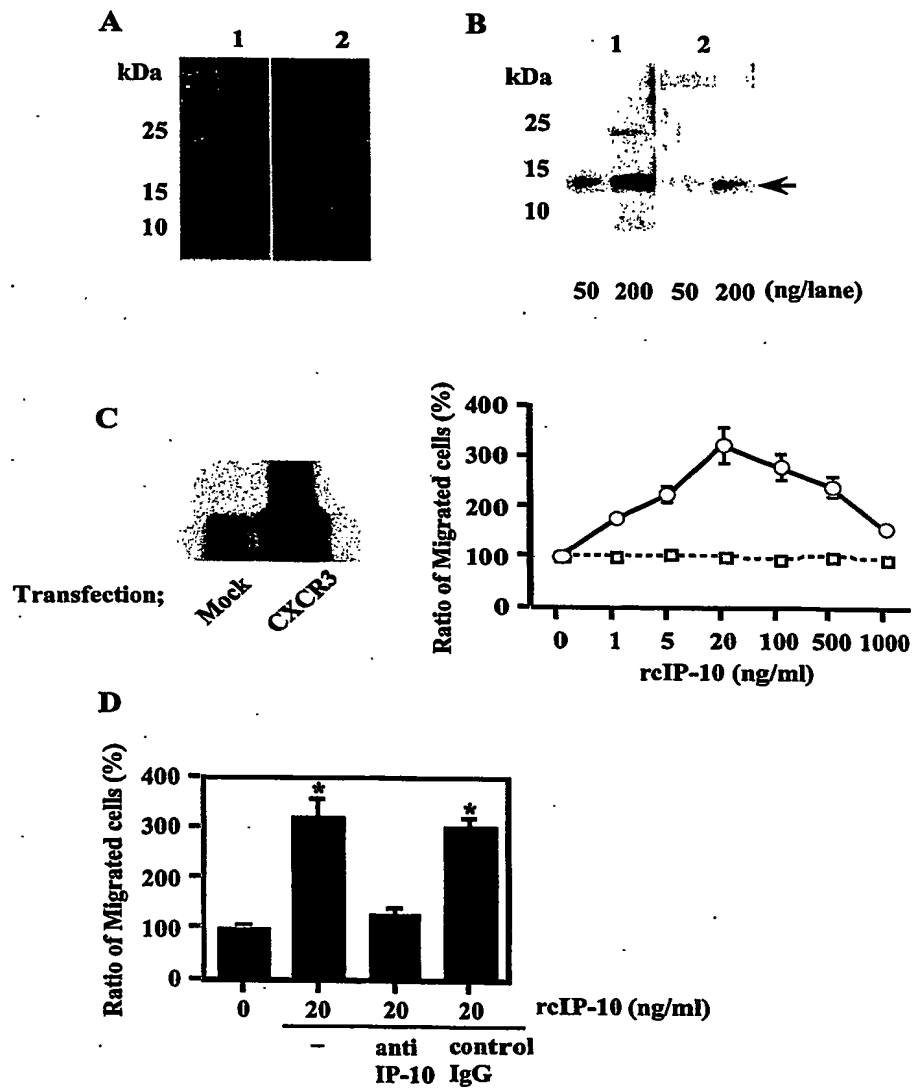
**C**



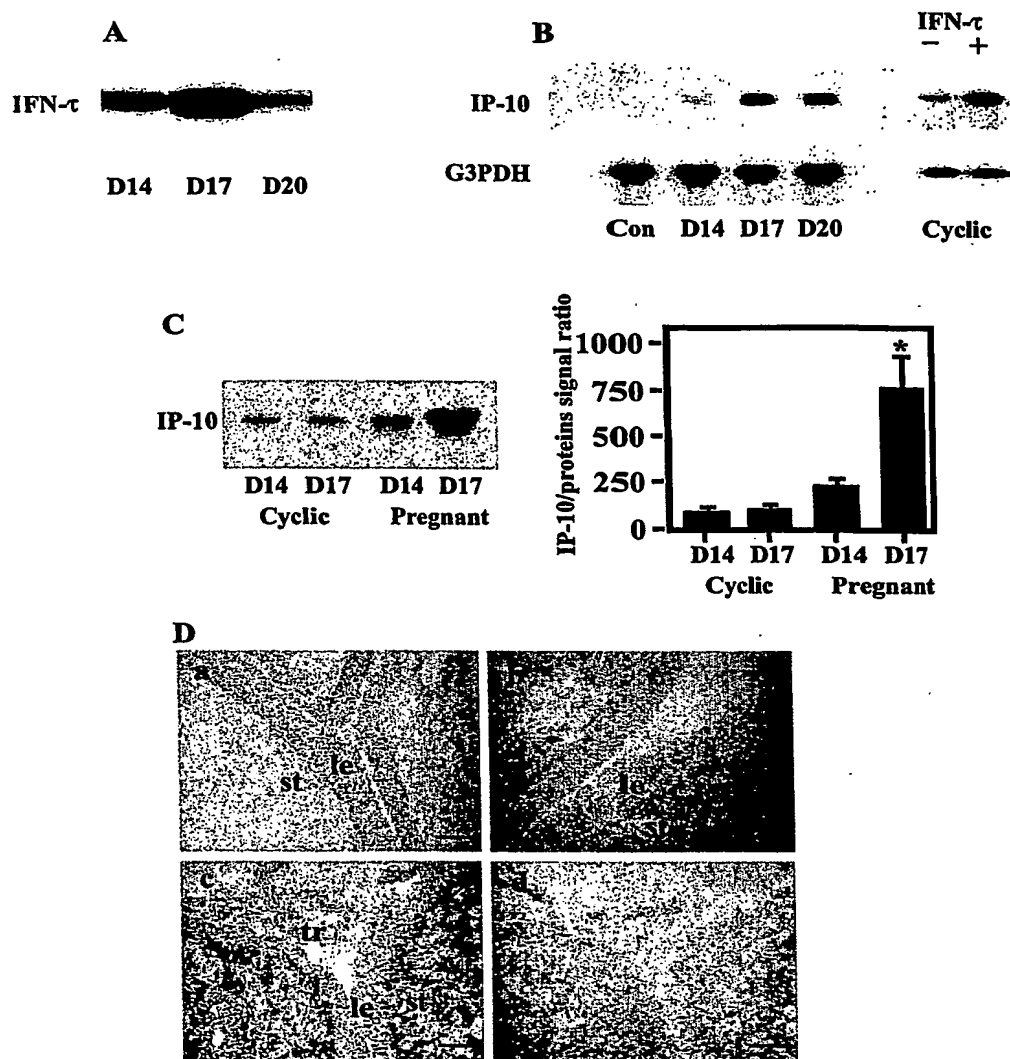
9 / 16



1 0 / 1 6



11 / 16



12 / 16

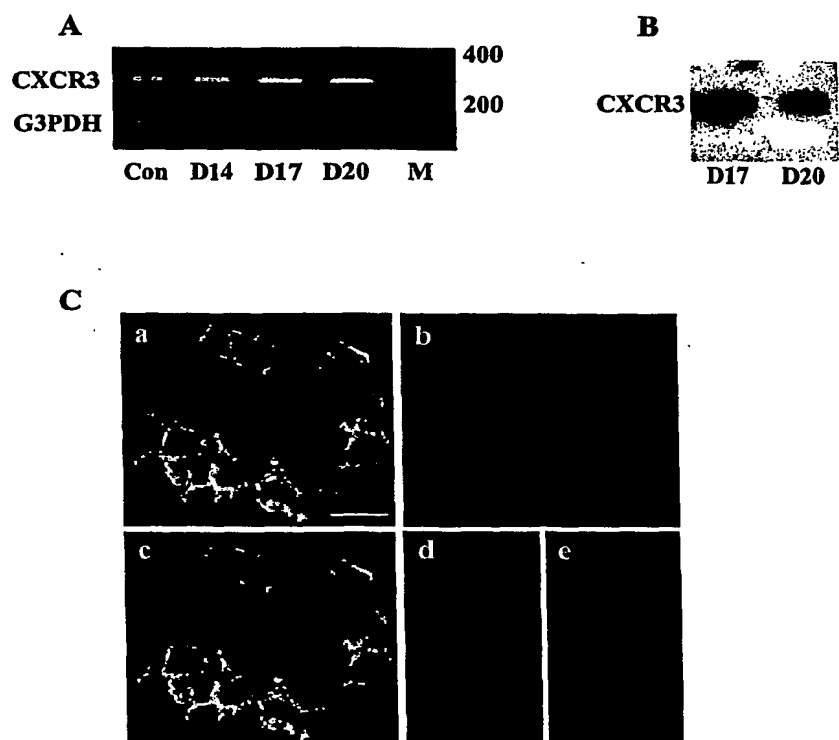


図 12

13 / 16

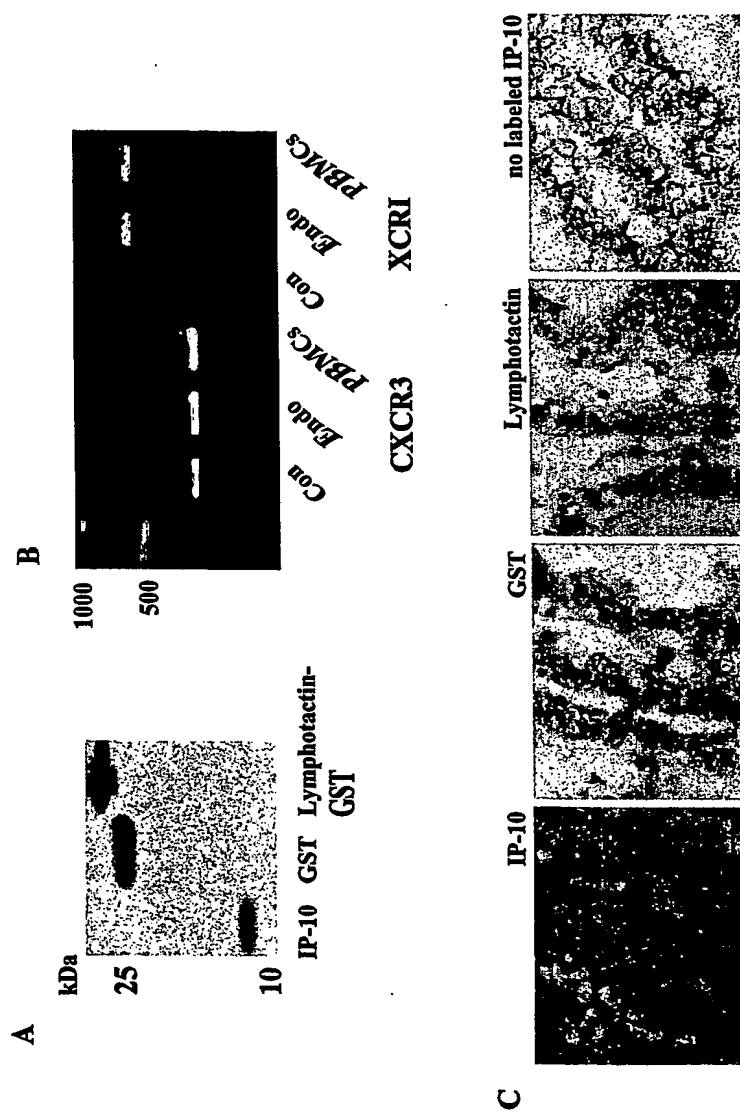
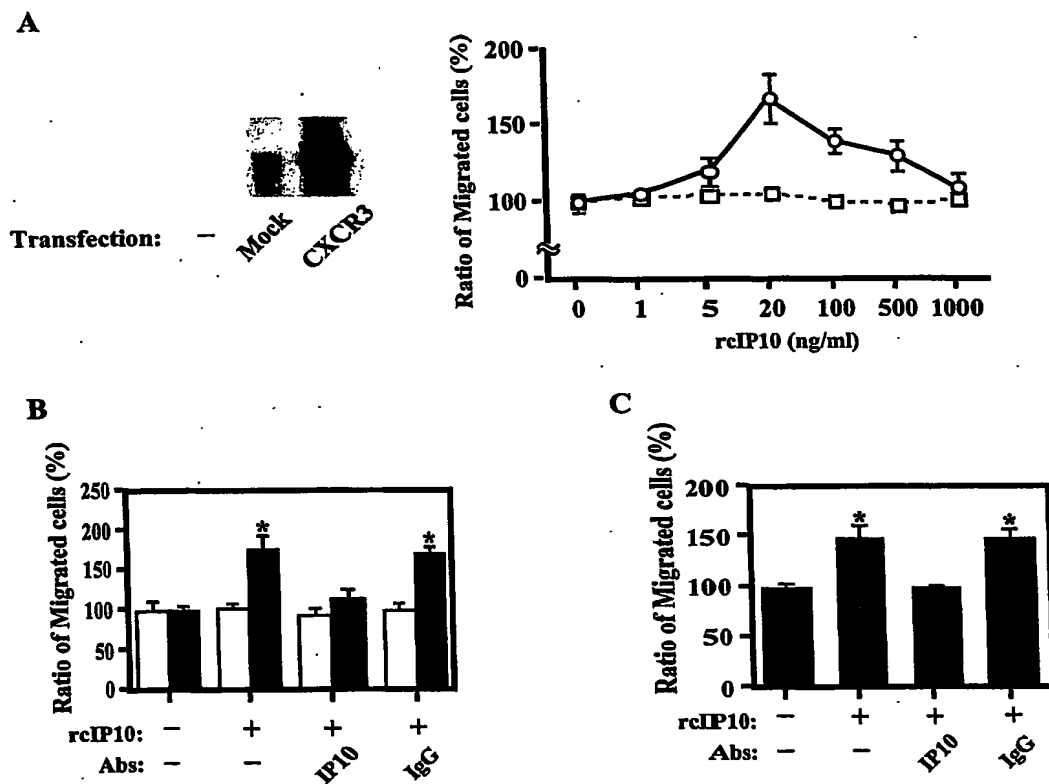
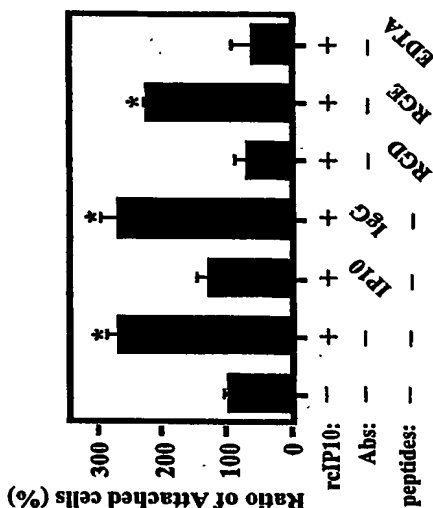


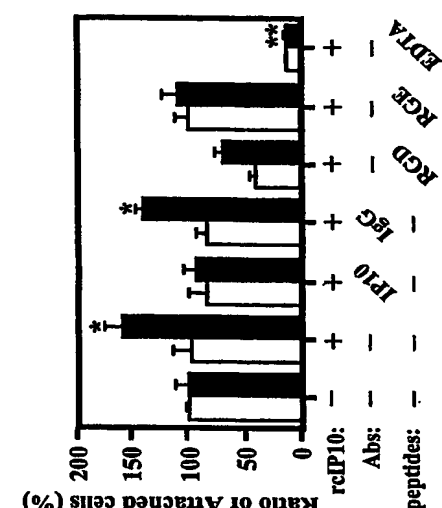
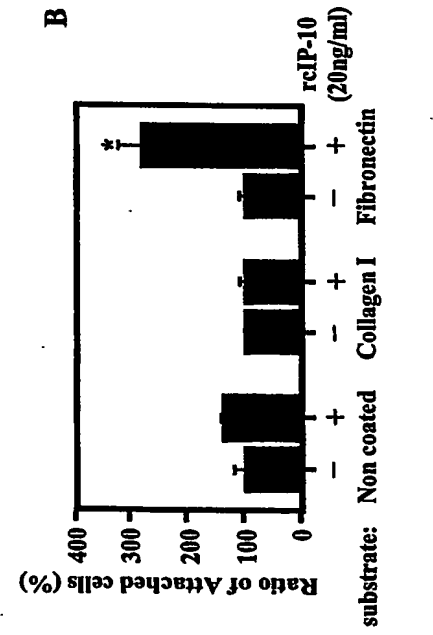
図 13

14 / 16

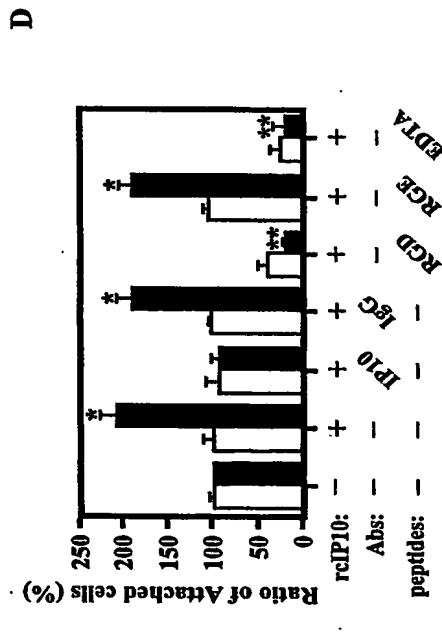




**B**



**D**





16 / 16

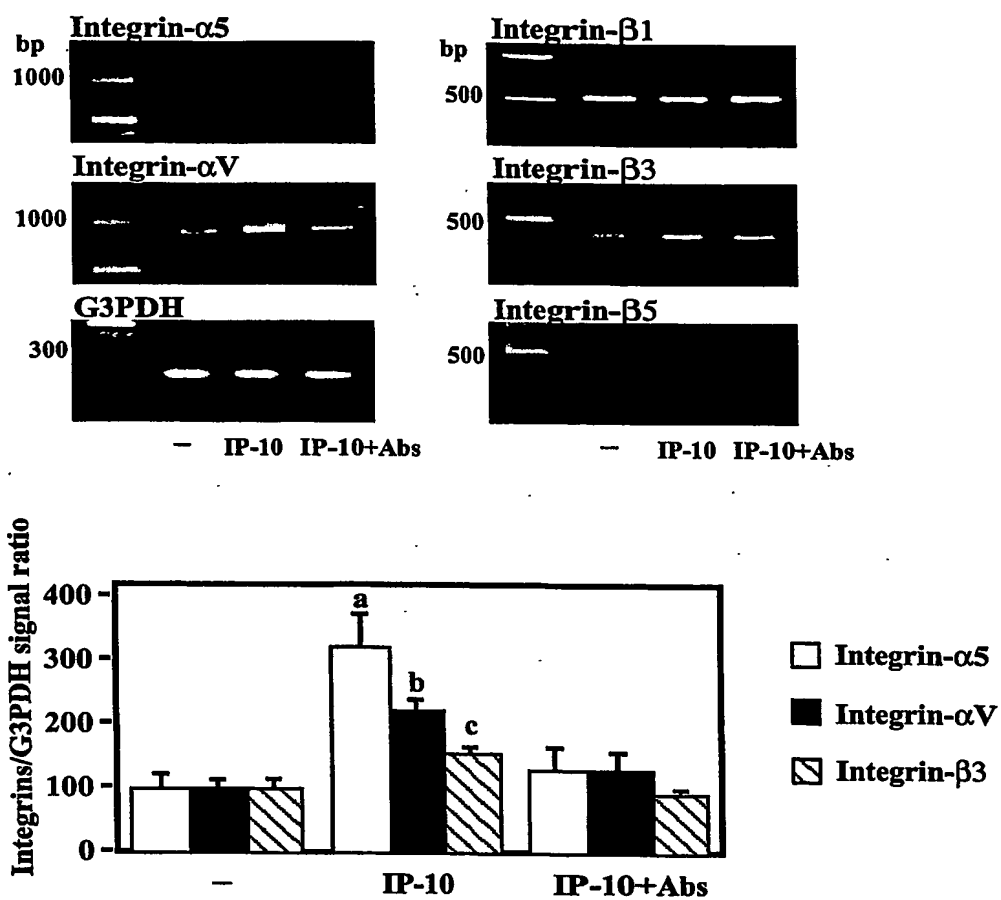


図 16

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; ProteinExpress Co., Ltd.

&lt;120&gt; Regulator for Implantation

&lt;130&gt; PE-01PCT

&lt;150&gt; JP 2002-259268

&lt;151&gt; 2002-9-4

&lt;160&gt; 26

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1171

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Ovis aries

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (60)..(368)

&lt;400&gt; 1

```

cactcctcaa ctcttcaggc agtctgagct actgcagaag taccttcagt tgcagcacc 59
atg aac aaa agt ggt ttt ctt att ttc tgc ctt atc ctt ctg act ctg 107
Met Asn Lys Ser Gly Phe Leu Ile Phe Cys Leu Ile Leu Leu Thr Leu
  1           5           10           15

agt caa ggc ata cct ctc tct agg aac aca cgc tgc acc tgc atc gag 155
Ser Gln Gly Ile Pro Leu Ser Arg Asn Thr Arg Cys Thr Cys Ile Glu
          20           25           30

atc agt aat gga tct gtt aat cca agg tcc tta gaa aaa ctt gaa ctg 203
Ile Ser Asn Gly Ser Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu Glu Leu
          35           40           45

att cct gca agt caa tcc tgc cca cgt gtc gag att att gcc aca atg 251
Ile Pro Ala Ser Gln Ser Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala Thr Met
          50           55           60

aaa agg aat ggg gag aaa aga tgt ctg aat cca gaa tct aag acc atc 299
Lys Arg Asn Gly Glu Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys Thr Ile
          65           70           75           80

aag aat tta ctg aaa gca att aac aag caa agg act aaa aga tct cct 347
Lys Asn Leu Leu Lys Ala Ile Asn Lys Gln Arg Thr Lys Arg Ser Pro
          85           90           95

cga aca cag aaa gag gca taa tcaactgcact actgataaga tggaccagag 398
Arg Thr Gln Lys Glu Ala
          100

```

2 / 8

agaagctacc tctacaattg tttccctgtg tacagtatat gtcaagccct aattgttcgt 458  
 ggacttcagt tctcctaaaa ggtgaccaag ccagtcacca aatcagctgc tactactcct 518  
 gcagggggag ggtggctcat caccctgagc tgttcagtag tgactctgcc ctggcactgt 578  
 gactgtaagc tataccgggg cgctacgttc tcagttaatg tgctaagtcc cagccttgct 638  
 actgacagct tcttcccctt tccaatcttt ctaggttatt aagggatctt tccagctctg 698  
 ggcttattag agaccttagg atctcaaata actaagagac attcaaacca ataatgcaat 758  
 ctgcttttta aagaaagatc tttactccag gggcttcact gccatccctc caagggggccc 818  
 gtattctttc aggtgttatg tacatagttc caaatataca gaagcagcca gaaatatctg 878  
 gaaatgtagg tctaaacagt attacttagt caaaaactat acaaagtaga attcttgaag 938  
 atatatgttt cttatatgat tttcagtgtt catggaataa cttgtataca actatcaact 998  
 tatgtaatta ttgcaatgga ataaattttt aaatttagat acatgttctg caggctatgt 1058  
 aagacaaata tgctaaatgc tttccaaaat aaaagtaatg ttctctccca gaaatactaa 1118  
 gaaagattat gtaattgttt tagaggccaa aaacataata aataattata act 1171

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 102

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Ovis aries

&lt;400&gt; 2

Met Asn Lys Ser Gly Phe Leu Ile Phe Cys Leu Ile Leu Leu Thr Leu  
 1 5 10 15

Ser Gln Gly Ile Pro Leu Ser Arg Asn Thr Arg Cys Thr Cys Ile Glu  
 20 25 30

Ile Ser Asn Gly Ser Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu Glu Leu  
 35 40 45

Ile Pro Ala Ser Gln Ser Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala Thr Met  
 50 55 60

Lys Arg Asn Gly Glu Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys Thr Ile  
 65 70 75 80

Lys Asn Leu Leu Lys Ala Ile Asn Lys Gln Arg Thr Lys Arg Ser Pro  
 85 90 95

Arg Thr Gln Lys Glu Ala  
 100

3 / 8

<210> 3  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR

<400> 3  
cactcctcaa ctcttcaggc 20

<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR

<400> 4  
ccattccttt tcattgtggc 20

<210> 5  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR

<400> 5  
gcatcagctt cgatcggtac 20

<210> 6  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR

<400> 6  
gatgcgggcg tagcaatagg 20

4 / 8

<210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR  
  
<400> 7  
catcttcccc atggccttcg 20  
  
<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR  
  
<400> 8  
tcattctcaaa gtgagttcag 20  
  
<210> 9  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR  
  
<400> 9  
cgatgaaata cacaagctcc 20  
  
<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR  
  
<400> 10  
gattacattg atgctctccg 20  
  
<210> 11  
<211> 20

5 / 8

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR

&lt;400&gt; 11

atggggaagg tgaaggtcgg

20

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR

&lt;400&gt; 12

atgtgggccca tgaggtccac

20

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR

&lt;400&gt; 13

atggggaagg tgaaggtcgg

20

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR

&lt;400&gt; 14

atgtgggccca tgaggtccac

20

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR

&lt;400&gt; 15

atggagccct cagacatccc

20

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR

&lt;400&gt; 16

gaggatctcc acgtacgaga

20

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR

&lt;400&gt; 17

tgctgtgaac cagagtcgtc

20

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR

&lt;400&gt; 18

atccactgca cagctgtggc

20

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

7 / 8

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR

<400> 19  
gaagcaggaa agagagcctg 20

<210> 20  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR

<400> 20  
ctatatccgt ggctcctttc 20

<210> 21  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR

<400> 21  
ctcaaatcca gccacagcag 20

<210> 22  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR

<400> 22  
ccagcgaagt gaaacacagc 20

<210> 23  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR



<400> 23  
agattggaga cacggtgagc

20

<210> 24  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR

<400> 24  
gtacttgaaa gtgatcttgc

20

<210> 25  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR

<400> 25  
gtctgaagat tggggacagc

20

<210> 26  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
to act as a primer for PCR

<400> 26  
ggtacacgct ctggttctcc

20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application N .

PCT/JP03/11268

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/00, A61K48/00, A61K39/395, A61K31/7088, A61P15/00, A61P37/02, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/50, G01N33/15, G01N33/68, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/00, A61K48/00, A61K39/395, A61K31/7088, A61P15/00, A61P37/02, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/50, G01N33/15, G01N33/68, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	NAGAOKA, K. et al., 'Regulation of blastocyst migration, apposition, ad initial adhesion by a chemokine, interferon gamma-inducible protein 10 kDa (IP-10), during early gestation.', J.Biol. Chem., 01 August, 2003 (01.08.03), Vol.278, No.31, pages 29048 to 29056	1,2,4-14, 18-22,26,27, 29,31
P,X	NAGAOKA, K. et al., 'A chemokine, interferon(IFN)-gamma-inducible protein 10kDa, is stimulated by IFN-tau and recruits immune cells in the ovine endometrium.', Biol.Reprod., April 2003, Vol.68, No.4, pages 1413 to 1421	1,2,4-14, 18-22,26,27, 29,31

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
08 December, 2003 (08.12.03)

Date of mailing of the international search report  
24 December, 2003 (24.12.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11268

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	IMAGAWA, NAGAOKA et al., 'Ninshin-Chakusho Katei no Kaimei ni Mukete', Japanese Society of Veterinary Science Gakujutsu Shukai Koen Yoshishu, 25 March, 2003 (25.03.03), Vol.135th, page 24, S-S1-6; full text; particularly, part of abstract, 4th line from the bottom to 3rd line from the bottom	1,2,4-14, 18-22,26,27, 29,31
X	NAGAOKA, NOJIMA et al., 'Chakushoki no Hitsuji Shikyunai ni Okeru IFN- $\gamma$ -inducible protein 10kDa (IP10) Chemokine no Hatsugen to Sono Kino', Japanese Society of Veterinary Science Gakujutsu Shukai Koen Yoshishu, 20 August, 2002 (20.08.02), Vol.134th, page 73, PL-010; full text; particularly, 5th line from the bottom to last line	1,2,4-14, 18-22,26,27, 29,31
X	KAI, K. et al., 'Expression of interferon-gamma-inducible protein-10 in human endometrial stromal cells.', Mol.Hum.Reprod., February 2002, Vol.8, No.2, pages 176 to 180; full text; particularly, abstract; page 176, left column, lines 11 to 14; right column, lines 11 to 15; page 179, left column, Discussion	1,2,4-14, 18-22,26,27, 29,31
A	WO 01/74841 A (SCRIPPS RES.INST.), 11 October, 2001 (11.10.01), Full text; particularly, Claims; page 2, line 31 to page 3, line 20; examples 12, 18; Fig. 17 & AU 2001/50904 B & EP 1272506 A1 & JP 2003-529354 A	1,2,4-14, 18-22,26,27, 29,31
A	WO 98/58962 A1 (TAKEDA CHEM.IND.LTD.), 30 December, 1998 (30.12.98), Full text; particularly, Claims 7 to 9, 15; page 48, line 4 & AU 9880373 B & JP 11-71300 A & EP 1001989 A1	1,2,4-14, 18-22,26,27, 29,31
A	WO 98/5323 A1 (CHILDRENS MEDICAL CENT), 12 February, 1998 (12.02.98), Full text; particularly, page 1, lines 24 to 30; page 4, lines 9 to 16, 32 to 33; page 5, line 19 to page 6, line 10; page 11, lines 1 to 4, 21 & AU 9739107 A1 & EP 957910 A2 & JP 2000-516585 A	1,2,4-14, 18-22,26,27, 29,31
A	WO 94/4670 A1 (HARVARD COLLEGE), 03 March, 1994 (03.03.94), Full text & US 5474981 A & JP 8-501085 A & EP 749475 A1 & US 5935567 A & US 6153600 A	1,2,4-14, 18-22,26,27, 29,31

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application N .

PCT/JP03/11268

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Rel vant to claim No.
A	WO 00/47228 A1 (LEXIGEN PHARM.CORP.), 17 August, 2000 (17.08.00), Full text & AU 2000/32280 B & EP 1156823 A1 & JP 2002-536419 A	1,2,4-14, 18-22,26,27, 29,31
A	ANGIOLILLO, A.L. et al., 'Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo.', J.Exp.Med., 1995, Vol.182, No.1, pages 155 to 162	1,2,4-14, 18-22,26,27, 29,31
A	WOOD, Gray W. et al., 'Relative role of CSF-1, MCP-1/JE, and RANTES in macrophage recruitment during successful pregnancy.', Molecular Reproduction and Development, 1997, Vol.46, No.1, pages 62 to 70	1,2,4-14, 18-22,26,27, 29,31
A	REZAIE, P. et al., 'Expression of $\beta$ -chemokines and chemokine receptors in human fetal astrocyte and microglial co-cultures: potential role of chemokines in the developing CNS.', GLIA, January 2002, Vol.37, No.1, pages 64 to 75	1,2,4-14, 18-22,26,27, 29,31
A	INNGJERDINGEN, M. et al., 'Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells.', Blood, 2001, Vol.97, No.2, pages 367 to 375	1,2,4-14, 18-22,26,27, 29,31
A	FARBER, J.M. et al., 'Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes.', J.Leukoc.Biol., 1997, Vol.61, No.3, pages 246 to 257	1,2,4-14, 18-22,26,27, 29,31
A	JINQUAN, T. et al., 'CXCR3 expression and activation of eosinophils: role of IFN-gamma-inducible protein-10 and monokine induced by IFN-gamma.', J.Immunol., 2000, Vol.165, No.3, pages 1548 to 1556	1,2,4-14, 18-22,26,27, 29,31
A	CELLA, M. et al., 'Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon.', Nat.Med., 1999, Vol.5, No.8, pages 919 to 923	1,2,4-14, 18-22,26,27, 29,31
A	LUSTER, A.D. et al., ' $\gamma$ -Interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins.', Nature, 1985, Vol.315, No.2, pages 672 to 676	1,2,4-14, 18-22,26,27, 29,31
A	WO 97/691 A1 (HARVARD COLLEGE), 09 January, 1997 (09.01.97), & EP 841935 A1 & US 5824299 A & JP 11-509187 A	1,2,4-14, 18-22,26,27, 29,31

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11268

## Box I. Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 3, 15 to 17, 23 to 25, 28, 30

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 3, 15 to 17, 23 to 25, 28, 30 involve methods for treatment of the human body by therapy and diagnostic methods and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) (Continued to extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/11268

Continuation of Box No.I-1 of continuation of first sheet(1)

of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> A61K38/00, A61K48/00, A61K39/395, A61K31/7088, A61P15/00, A61P37/02, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/50, G01N33/15, G01N33/68, G01N33/53

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> A61K38/00, A61K48/00, A61K39/395, A61K31/7088, A61P15/00, A61P37/02, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/50, G01N33/15, G01N33/68, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLus (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	NAGAOKA, K. et al. 'Regulation of blastocyst migration, apposition, ad initial adhesion by a chemokine, interferon gamma-inducible protein 10 kDa (IP-10), during early gestation.' J. Biol. Chem., 1 Aug. 2003, vol. 278, no. 31, p. 29048-29056	1, 2, 4-14, 18-22, 26, 27, 29, 31
P, X	NAGAOKA, K. et al. 'A chemokine, interferon (IFN)-gamma-inducible protein 10kDa, is stimulated by IFN-tau and recruits immune cells in the ovine endometrium.' Biol. Reprod., Apr. 2003, vol. 68, no. 4, p. 1413-1421	1, 2, 4-14, 18-22, 26, 27, 29, 31

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.12.03

国際調査報告の発送日

24.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大久保元浩



4C

8828

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	今川・永岡他 ‘妊娠・着床過程の解明に向けて’ 日本獣医学会 学術集会講演要旨集, 25 Mar. 2003, vol. 135th, p. 24 S-S1-6 文献全体、特に要旨部分下から第4-3行	1, 2, 4-14, 18-22, 26, 27, 29, 31
X	永岡・野島他 ‘着床期のヒツジ子宮内における IFN- $\gamma$ -inducibl e protein 10kDa (IP10) ケモカインの発現とその機能’ 日本獣 医学会学術集会講演要旨集, 20 Aug. 2002, vol. 134th, p. 73 PL-0 10, 文献全体、特に下から第5-最下行	1, 2, 4-14, 18-22, 26, 27, 29, 31
X	KAI, K. et al. ‘Expression of interferon-gamma-inducible pro tein-10 in human endometrial stromal cells.’ Mol. Hum. Repr od., Feb. 2002, vol. 8, no. 2, p. 176-180 文献全体、特に abst ract, p. 176左欄第11-14行、同頁右欄第11-15行、p. 179左欄Discus sion	1, 2, 4-14, 18-22, 26, 27, 29, 31
A	WO 01/74841 A1 (SCRIPPS RES INST) 2001. 10. 11 文献全体、特 にclaims、p. 2第31行-p. 3第20行、EXAMPLE12・18、Figure17 & AU 2001/50904 B & EP 1272506 A1 & JP 2003-529354 A	1, 2, 4-14, 18-22, 26, 27, 29, 31
A	WO 98/58962 A1 (TAKEDA CHEM IND LTD) 1998. 12. 30 文献全 体、特にclaim7-9, 15, p. 48第4行 & AU 9880373 B & JP 11 -71300 A & EP 1001989 A1	1, 2, 4-14, 18-22, 26, 27, 29, 31
A	WO 98/5323 A1 (CHILDRENS MEDICAL CENT) 1998. 02. 12 文献全 体、特にp. 1第24-30行、p. 4第9-16行、同頁第32-33行、p. 5第19行 -p. 6第10行、p. 11第1-4行、同頁第21行 & AU 9739107 A1 & EP 957910 A2 & JP 2000-516585 A	1, 2, 4-14, 18-22, 26, 27, 29, 31
A	WO 94/4670 A1 (HARVARD COLLEGE) 1994. 03. 03 文献全体 & US 5474981 A & JP 8-501085 A & EP 749475 A1 & US 5 935567 A & US 6153600 A	1, 2, 4-14, 18-22, 26, 27, 29, 31
A	WO 00/47228 A1 (LEXIGEN PHARM CORP) 2000. 08. 17 文献全体 & AU 2000/32280 B & EP 1156823 A1 & JP 2002-536419 A	1, 2, 4-14, 18-22, 26, 27, 29, 31



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	ANGIOLILLO, A. L. et al. 'Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo.' J. Exp. Med., 1995, vol.182, no.1, p.155-162	1, 2, 4-14, 18-22, 26, 27, 29, 31
A	WOOD, Gray W. et al. 'Relative role of CSF-1, MCP-1/JE, and RANTES in macrophage recruitment during successful pregnancy.' Molecular Reproduction and Development, 1997, vol.46, no.1, p.62-70	1, 2, 4-14, 18-22, 26, 27, 29, 31
A	REZAIE, P. et al. 'Expression of $\beta$ -chemokines and chemokine receptors in human fetal astrocyte and microglial co-cultures: potential role of chemokines in the developing CNS.' GLIA, Jan.2002, vol.37, no.1, p.64-75	1, 2, 4-14, 18-22, 26, 27, 29, 31
A	INNGJERDINGEN, M. et al. 'Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells.' Blood, 2001, vol.97, no.2, p.367-375	1, 2, 4-14, 18-22, 26, 27, 29, 31
A	FARBER, J. M. et al. 'Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes.' J. Leukoc. Biol., 1997, vol.61, no.3, p.246-257	1, 2, 4-14, 18-22, 26, 27, 29, 31
A	JINQUAN, T. et al. 'CXCR3 expression and activation of eosinophils: role of IFN-gamma-inducible protein-10 and monokine induced by IFN-gamma.' J. Immunol., 2000, vol.165, no.3, p.1548-1556	1, 2, 4-14, 18-22, 26, 27, 29, 31
A	CELLA, M. et al. 'Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon.' Nat. Med., 1999, vol.5, no.8, p.919-923	1, 2, 4-14, 18-22, 26, 27, 29, 31
A	LUSTER, A. D. et al. ' $\gamma$ -Interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins.' Nature, 1985, vol.315, no.20, p.672-676	1, 2, 4-14, 18-22, 26, 27, 29, 31

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 97/691 A1 (HARVARD COLLEGE) 1997.01.09 & EP 841935 A1 & US 5824299 A & JP 11-509187 A	1, 2, 4-14, 18-22, 26, 27, 29, 31

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 3, 15-17, 23-25, 28, 30 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲 3, 15-17, 23-25, 28, 30 は、治療による人体の処置方法に関する態様もしくは人体の診断方法に係る態様を含むものであるから、PCT第17条(2)(a)(i) 及びPCT規則39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**